

AIU

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/40668 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Oktober 2001 (30.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE  
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **APOTECH RESEARCH & DEVELOPMENT LTD.** [CH/CH]; 84, Rue de Rhone, CH-1204 Genf (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **TSCHOPP, Jürg** [CH/CH]; 10, ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges (CH). **MARTINON, Fabio** [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004 Lausanne (CH).

(74) Anwälte: **GRAF VON STOSCH, Andreas** usw.; Bosch, Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München (DE).

**Veröffentlicht:**

*ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMATIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA-SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences, to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.

WO 02/40668 A2



**Proteine und den Proteinen zugrundeliegende DNA-Sequenzen  
mit Funktion bei Entzündungsereignissen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für  
mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren,  
die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die  
mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind,  
10 aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen,  
Antikörper gegen die vorgenannten Genprodukte, Verfahren  
zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten  
Genprodukte und die Verwendung der DNA-Sequenzen oder der  
Genprodukte zur Behandlung von Entzündungsereignissen.
- 15 Proteine weisen einen modularen Aufbau auf, wobei die  
einzelnen Abschnitte von Proteinen strukturell und ggf.  
funktionell selbständig sind. Diese Abschnitte werden  
Domänen genannt. Proteine mit modularem Aufbau treten  
beispielsweise bei Proteinen der apoptotischen  
20 Signaltransduktionskette auf (Aravind et al. (1999) TIBS,  
24, 47-53; Hofmann (1999) Cell. Mol. Life. Sci., 55,  
1113-28). Für die Klasse der apoptotischen  
Signaltransduktionsproteine wären drei Familien von  
Domänen zu nennen, nämlich die Familie der Todesdomänen

(DD), die Familie der Todeseffektordomänen (DED) und die Familie der Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), die alle entfernt miteinander verwandt sind und auch alle einer Superfamilie angehören, die typischerweise in ihrer 3-dimensionalen Struktur ein Bündel von sechs Helices ("six helix bundle") bildet. Zu jenen Proteinen, die eine Todesdomäne, Todeseffektordomäne und/oder eine CARD-Domäne aufweisen, gehören beispielsweise die Proteine FLIP, CARDIAK-RIP2, ARC, Bcl10, DEDD, wie in den Veröffentlichungen von Irmeler et al., 1997, Nature, 388, 190-195; Koseki et al. 1998, Proct. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5156-60; McCarthy et al. 1998, J. Biol. Chem. 273, 16968-16975; Stegh, et al., 1998, EMBO J., 17, 5974-86; Thome et al., 1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8 gezeigt. Während also zahlreiche Proteine, die Domänen der strukturellen Superfamilie (Bündel aus sechs Helices) aufweisen, in intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse verwickelt sind, insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit zur Assoziierung mit vor- bzw. in der Signaltransduktion nachgeschalteten Proteinen, sind die an der Entzündungsreaktion beteiligten Proteine, ebenso wie die Form der Signalübertragung bei inflammatorischen Reaktionen weitgehend unbekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es einerseits, solche Proteine (mit ihren Aminosäuresequenzen) und ggf. den zugrundeliegenden DNA-Sequenzen zu identifizieren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, oder aus anderem Zusammenhang bekannten Proteinen eine Funktion in der Entzündungsreaktionskaskade zuzuweisen und andererseits, durch Bestimmung der Signaltransduktionsmechanismen, Stoffe zur Behandlung inflammatorischer Reaktionen zur Verfügung zu stellen.

Zur Lösung dieser Aufgabe haben die Erfinder zunächst festgestellt, daß PYD-Domänen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Weitergabe eines inflammatorischen Signals spielen. Erfindungsgemäß wurde

festgestellt, daß die Domäne PYD ebenfalls die Struktur des Bündels aus 6 Helices aufweist und daß sie in ihrem Interaktionspotential mit den insoweit strukturell verwandten Domänen DED, DD oder CARD vergleichbar ist.  
5 Damit wird erfindungsgemäß eine vierte Familie von "Sechs-Helix-Bündel"-Domänen (hier als Domäne "PYD" bezeichnet), die als Bestandteil von nativen Proteinen auftritt, zur Verfügung gestellt.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher DNA-Sequenzen, die für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codieren, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele. Insbesondere sind alle DNA-Sequenzen mit umfaßt, die mit den erfindungsgemäßen  
15 DNA-Sequenzen hybridisieren, einschließlich der jeweils im Doppelstrang komplementären Sequenzen (Anspruch 1).

In Hinblick auf die Hybridisierungsbedingungen wird im einzelnen offenbart, dass homologe oder sequenzverwandte DNA-Sequenzen aus allen Säugerspezies, einschließlich  
20 Mensch, nach gängigen Verfahren durch Homologie-Screening durch Hybridisierung mit einer Probe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Teilen davon isoliert werden. Unter funktionellen Äquivalenten sind auch Homologe der nativen PYD-Domänen enthaltenden  
25 Sequenzen, bspw. der in Figur 1 dargestellten Sequenzen, beispielsweise ihre Homologen aus anderen Mammalia, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nicht-codierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

30 Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche, die auf dem Fachmann bekannte Weise ermittelt werden können, verwendet. In jedem Fall wird die Verwendung und Funktion von mindestens 15, vorzugsweise mindestens 20 AS langen Nukleotidabschnitten  
35 (auch als solche offenbart) der in Figur enthaltenen Nukleotidsequenzen als Primer für PCR-Reaktionen oder als

Oligonukleotide auf DNA-Chips offenbart. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure-Sequenz (Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz) bzw. je nachdem, welche Nukleinsäureart (DNA oder RNA) für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge. Unter Standardbedingungen sind beispielsweise, je nach Nukleinsäure, Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid, wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid, zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise bei Sambrook et al. ("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln, beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausübel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John

Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach,  
5 IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden solche erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen offenbart, für die sich ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-2}$  ergibt, wenn die PYD-  
10 Domäne einer Ziel-DNA-Sequenz (also einer potentiell erfindungsgemäßen DNA-Sequenz) mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird (Anspruch 2). In Hinblick auf die diesbezügliche experimentelle Vorgehensweise wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem.,  
15 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden DNA-Sequenzen offenbart, deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält.  
25 Vorteilhafterweise weisen derartige Derivate oder Allele eine Sequenzhomologie von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 90% und noch stärker bevorzugt von mindestens 95% und am stärksten bevorzugt von mindestens 98% mit der vorgenannten Sequenz auf. Auch mit diesen  
30 erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisierende DNA-Sequenzen (einschließlich der Sequenzen des komplementären DNA-Stranges) sind mitoffenbart (Anspruch 3).

35 Bevorzugt sind weiterhin DNA-Sequenzen, die eine der in Figur 1 angegebenen (c)DNA-Sequenzen enthalten (Anspruch

4). Im Zuge der erfindungsgemäßen Feststellungen wurde nämlich herausgefunden, daß erfindungsgemäße DNA-Sequenzen für zahlreiche Proteine (Aminosäuresequenzen) mit einer PYD-Domäne codieren, die insbesondere auch am  
5 ggf. pathophysiologischen Inflammationsgeschehen beteiligt sind. Diese DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) sind in Fig. 1 dargestellt. Hierzu gehören, wie in Figur 1 jeweils mit Codierungsnummer dargestellt, die Proteine Pyrin (siehe  
10 entsprechende Protein- bzw. cDNA-Sequenzen gemäß Fig. 1, Codierungsnummer 1.2), Pycard (Protein und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.3), Pyc (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.1), NALP1 (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.4), NALP2 ((alter Name  
15 Py7) mit Protein- und einer DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.5), NALP3 ((alter Name PY5) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.6), NALP4 ((alter Name PY6) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.7), NALP5 ((alter Name Py8) mit Proteinsequenz und DNA-  
20 Sequenz, Codierungsnummer 1.8), NALP6 ((alter Name PY9) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.9), PY10 (mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.10), NALP7 ((alter Name Py11) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.11),  
25 NALP8 ((alter Name Py12) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.12), NALP9 ((alter Name Py13) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.13), NALP10 ((alter Name Py14) mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.14), NALP11 ((alter Name  
30 Py15) mit Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.15), Py16 ((von der Maus), mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.16), NALP13 ((alter Name Py17), mit Protein- und CDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.17), NALP14 ((alter Name Py18), von der Maus, mit  
35 Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.18), NALP15 ((alter Name Py19) mit Protein- und partieller DNA-

Sequenz, Codierungsnummer 1.19), NALP12 ((alter Name Py20), von der Maus, mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.20). Die vorgenannten Sequenzen sind sämtlich in Figur 1 aufgetragen und dort unter den  
5 vorgenannten Bezeichnungen bzw. den Codierungsnummern auffindbar. Die zusammengehörigen, d. h. unter einer Codierungsnummer zusammengefaßten DNA- und Proteinsequenzen sind jeweils durch gepunktete Linien im Fettdruck von der nächsten Einheit getrennt. Figur 1  
10 umfaßt 22 durchnummerierte Seiten. Damit handelt es sich bei einem weiteren bevorzugten Gegenstand der vorliegenden Erfindung um DNA-Sequenzen, die für eines der in Figur 1 dargestellten Genprodukte (d.h. für eine der in Figur 1 enthaltenen Aminosäuresequenzen) codieren  
15 oder DNA-Sequenzen, die zumindest in einem Abschnitt der Gesamtsequenz für eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen codieren (Anspruch 5).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind  
20 Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, bspw. wie zuvor offenbart oder gemäß Ansprüchen 1 bis 5 beansprucht, enthalten (Anspruch 6). Derartige erfindungsgemäße Expressionsvektoren (bspw. Plasmide) enthalten neben mindestens einer erfindungsgemäßen DNA-  
25 Sequenz typischerweise auch Promotor-Bereiche und Terminator-Bereiche, ggf. auch Marker-Gene (bspw. Antibiotika-Resistenz-Gene) und/oder Signalsequenzen zum Transport des translatierten Proteins.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert wurden (Anspruch 7). Als geeignete Wirtszellen zur Klonierung oder Exprimierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kommen Prokaryotenhefen  
35 oder höhere eukaryotische Zellen in Frage. Bei Prokaryoten sind Gram-negative oder Gram-positive Organismen

ausdrücklich eingeschlossen. Zu nennen ist hier E.coli oder Bazillen. Als bevorzugte Wirtszellen zur Klonierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden die Stämme E.coli 294, E.coli B und E.coli X1776 sowie E.coli W3110  
5 offenbart. Bei den Bazillen stehen *Bazillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* oder ähnliche. Wie oben bereits erwähnt, enthalten die Expressionsvektoren typischerweise eine Signalsequenz zum Transport des Proteins in das Kulturmedium, so werden prokaryotische Zellen eingesetzt  
10 werden. Neben Prokaryoten kommen auch eukaryotische Mikroben als Wirtszellen, die mit dem Expressionsvektor transfiziert worden sind, in Frage. So etwa können filamentöse Pilze oder Hefen als geeignete Wirtszellen für die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierende Vektoren  
15 eingesetzt werden. Zu nennen ist vor allem *Saccharomyces cerevisiae* oder die gewöhnliche Bäckerhefe (Stinchcomb et al., Nature, 282:39, (1997)).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden jedoch zur  
20 Expression von erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen Zellen aus multizellulären Organismen gewählt. Dies geschieht auch vor dem Hintergrund einer möglicherweise erforderlichen Glykosilierung der codierten Proteine. Diese Funktion kann in höheren Eukaryotenzellen - im Vergleich zu  
25 Prokaryotenzellen - in geeigneter Weise ausgeführt werden. Im Prinzip ist jede höhere eukaryotische Zellkultur als Wirtszelle verfügbar, wenn auch Zellen von Säugern, beispielsweise Affen, Ratten, Hamstern oder Menschen, ganz besonders bevorzugt sind. Dem Fachmann ist eine Vielzahl  
30 von etablierten Zelllinien bekannt. In einer keineswegs abschließenden Aufzählung werden die folgenden Zelllinien genannt: 293T (Embryonennierenzelllinie), (Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1997)), BHK (Babyhamsternierenzellen), CHO (Zellen aus den  
35 Hamsterovarien), (Urlaub und Chasin, P. N. A. S. (USA)

77:4216, (1980)), HeLa (humane Cervixkarzinomzellen) und weitere Zelllinien.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind mit Expressions-  
5 vektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen aufweisen, vorzugsweise Zellen des Säugetierimmunsystems, vor allem des humanen Immunsystems, transfiziert (Anspruch 8).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind die  
10 Genprodukte der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen (Anspruch 9). Unter Genprodukten versteht man im Sinne dieser Erfindung sowohl Primärtranskripte, also RNA, vorzugsweise mRNA, als auch Proteine bzw. Polypeptide, insbesondere in aufgereinigter Form (Anspruch 10). Diese Proteine weisen  
15 erfindungsgemäß mindestens eine PYD-Domäne auf und regulieren oder transportieren insbesondere inflammatorische Signale. Bevorzugt ist ein aufgereinigtes Genprodukt dann, wenn es eine der in Figur 7 angegebenen Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich  
20 aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate enthält. Zu den erfindungsgemäßen Proteinen gehören aber auch all jene Proteine, die sich von erfindungsgemäßen DNA-Derivaten, DNA-Fragmenten oder DNA-Allelen ableiten.

25 Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Proteine chemisch modifiziert sein. So etwa kann eine Schutzgruppe am N-Terminus vorliegen. Es können Glykosylgruppen an Hydroxyl- oder Aminogruppen angefügt sein, Lipide (insbesondere Fettsäuren, bspw. Myristyl- oder  
30 Palmitylsäure) können kovalent mit dem erfindungsgemäßen Protein verbunden sein, ebenso Phosphate oder Acetylgruppen und ähnliches. Auch beliebige chemische Substanzen, Verbindungen oder Gruppen können auf einem beliebigen Syntheseweg an das erfindungsgemäße Protein  
35 gebunden sein. Auch zusätzliche Aminosäuren, z.B. in Form einzelner Aminosäuren oder in Form von Peptiden oder in

Form von Proteindomänen und ähnliches, können mit dem N- und/oder C-Terminus fusioniert sein. Insbesondere sind hier sogenannte Signal- oder "Leader"-Sequenzen am N-Terminus der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz vorliegen, die das Peptid cotranslational oder posttranslational in eine bestimmte Zellorganelle oder in den extrazellulären Raum (bzw. das Kulturmedium) führen. Am N- oder am C-Terminus können auch Aminosäuresequenzen vorliegen, die als Antigen die Bindung der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz an Antikörper erlauben. Zu nennen ist hier insbesondere das Flag-Peptid, dessen Sequenz im Einbuchstabencode der Aminosäuren lautet: DYKDDDDK oder auch His-Tags (mindestens 5, vorzugsweise mindestens 6 His-Reste). Diese Sequenz hat stark antigene Eigenschaften und erlaubt somit eine schnelle Überprüfung und leichte Reinigung des rekombinanten Proteins. Monoklonale Antikörper, die das Flag-Peptid binden, sind von der Firma Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut erhältlich. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in zahlreichen Exons, die durch Introns voneinander getrennt sind, auf dem Strang des Erbinformationsmoleküls abgelegt sein. Damit gehören auch alle denkbaren SPLICE-Varianten (auf mRNA-Ebene) als Genprodukte zum erfindungsgemäßen Gegenstand. Auch die von diesen verschiedenen SPLICE-Varianten codierten Proteine unterfallen dieser Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper, der ein Epitop auf einem erfindungsgemäßen Genprodukt, insbesondere einem erfindungsgemäßen Protein, erkennt (Anspruch 12). Der Begriff "Antikörper" umfaßt i.S. der vorliegenden Erfindung sowohl polyklonale Antikörper als auch monoklonale Antikörper (Anspruch 13), chimäre Antikörper, anti-idiotypische Antikörper (gerichtet gegen

erfindungsgemäße Antikörper), die alle in gebundener oder löslicher Form vorliegen und ggf. durch "Label" markiert sein können, sowie auch Fragmente der vorgenannten Antikörper. Neben den Fragmenten von erfindungsgemäßen Antikörpern in Alleinstellung können erfindungsgemäße Antikörper auch in rekombinanter Form als Fusionsproteine mit anderen (Protein)-Bestandteilen auftreten. Fragmente als solche oder Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern als Bestandteile von Fusionsproteinen werden typischerweise durch die Methoden enzymatischer Spaltung, der Protein-Synthese oder die dem Fachmann geläufigen Rekombinationsmethoden hergestellt.

Bei den polyklonalen Antikörpern handelt es sich um heterogene Mischungen von Antikörpermolekülen, die aus Seren von Tieren hergestellt werden, die mit einem Antigen immunisiert worden sind. Ein monoklonaler Antikörper enthält eine im wesentlichen homogene Population von Antikörpern, die spezifisch gegen Antigene gerichtet sind, wobei die Antikörper im wesentlichen gleiche Epitop-Bindungsstellen aufweisen. Monoklonale Antikörper können durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren erhalten werden (z. B. Köhler und Milstein, Nature, 256, 495-397, (1975); US-Patent 4,376,110; Ausübel et al., Harlow und Lane "Antikörper": Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory (1988)). Die in den vorgenannten Literaturstellen enthaltene Beschreibung wird als Bestandteil der vorliegenden Erfindung in die Offenbarung der vorliegenden Erfindung einbezogen. Erfindungsgemäße Antikörper können einer der folgenden Immunglobulinklassen angehören: IgG, IgM, IgE, IgA, GILD und ggf. einer Unterklasse der vorgenannten Klassen. Ein Hybridom-Zellklon, der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper produziert, kann in vitro, in situ oder in vivo kultiviert werden. Die Herstellung von großen Titern an monoklonalen Antikörpern erfolgt vorzugsweise in vivo oder in situ.

Bei den erfindungsgemäßen chimärische Antikörpern handelt es sich um Moleküle, die verschiedene Bestandteile enthalten, wobei diese sich aus verschiedenen Tierarten ableiten (z. B. Antikörper, die eine variable Region, die aus einem Mäuse-monoklonalen Antikörper abgeleitet ist, und eine konstante Region eines humanen Immunglobulin aufweisen). Chimärische Antikörper werden vorzugsweise eingesetzt, um einerseits die Immunogenizität bei der Anwendung zu reduzieren und andererseits die Ausbeuten bei der Produktion zu erhöhen, z.B. ergeben murine monoklonale Antikörper höhere Ausbeuten aus Hybridom-Zelllinien, führen aber auch zu einer höheren Immunogenizität beim Menschen, so daß human/murine chimärische Antikörper vorzugsweise eingesetzt werden. Chimärische Antikörper und Verfahren zu ihrer Herstellung sind aus dem Stand der Technik bekannt (Cabilly et al., Proc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al. Nature 312 643-646 (1984); Cabilly et al., EP-A-125023; Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., EP-A-171496; Morrion et al., EP-A-173494; Neuberger et al., WO 86/01533; Kudo et al., EP-A-184187; Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., WO 87/02671; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:214218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) und Harlow und Lane, Antikörper: A Laboratory Manual, wie oben zitiert. Diese Zitatstellen werden als zur Offenbarung gehörig in die vorliegende Erfindung einbezogen.

Ganz besonders bevorzugt wird ein solcher erfindungsgemäßer Antikörper gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet sein (Anspruch 14).

Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper ist ein Antikörper, der eine Determinante, die im allgemeinen

mit der Antigenbindungsstelle eines erfindungsgemäßen Antikörpers assoziiert ist, erkennt. Ein anti-idiotypischer Antikörper kann durch die Immunisierung eines Tieres der gleichen Art und des gleichen genetischen Typs (z.B. eines Mäusestamms) als Ausgangspunkt für einen monoklonalen Antikörper, gegen welchen ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper gerichtet ist, hergestellt werden. Das immunisierte Tier wird die idiotypischen Determinanten des immunisierenden Antikörpers durch die Produktion eines Antikörpers, der gegen die idiotypischen Determinanten gerichtet ist (nämlich ein erfindungsgemäßer anti-idiotischer Antikörper), erkennen (U.S. 4,699,880). Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper kann auch als Immunogen eingesetzt werden, um eine Immunantwort in einem weiteren Tier hervorzurufen und um dort zur Produktion eines sog. anti-anti-idiotypischen Antikörpers zu führen. Der anti-anti-idiotypische Antikörper kann, muß aber nicht, bezüglich seiner Epitop-Konstruktion identisch mit dem originären monoklonalen Antikörper sein, der die anti-idiotypische Reaktion hervorgerufen hat. Auf diese Weise können durch die Verwendung von gegen idiotypische Determinanten eines monoklonalen Antikörpers gerichtete Antikörper andere Klone, die Antikörper von identischer Spezifität exprimieren, identifiziert werden.

Monoklonale Antikörper, die gegen erfindungsgemäße Proteine, Analoge, Fragmente oder Derivate dieser erfindungsgemäßen Proteine gerichtet sind, können eingesetzt werden, um die Bindung von anti-idiotypischen Antikörpern in entsprechenden Tieren, wie z. B. der BALB/c Maus, zu induzieren. Zellen aus der Milz einer solchen immunisierten Maus können verwendet werden, um anti-idiotypische Hybridom-Zelllinien, die anti-idiotypische monoklonale Antikörper sekretieren, zu produzieren. Weiterhin können anti-idiotypische monoklonale Antikörper auch an einen Träger gekoppelt

werden (KLH, "keyhole limpet hemocyanin") und dann verwendet werden, um weitere BALB/c-Mäuse zu immunisieren. Die Sera dieser Mäuse enthalten dann anti-anti-idiotypische Antikörper, die die Bindungseigenschaften der originären monoklonalen Antikörper haben und spezifisch für ein Epitop des erfindungsgemäßen Proteins oder eines Fragments oder Derivats von demselben sind. Die anti-idiotypischen monoklonalen Antikörper haben auf diese Weise ihre eigenen idiotypischen Epitope oder "Idiotope", die strukturell mit dem zu untersuchenden Epitop ähnlich sind.

Die Bezeichnung "Antikörper" soll sowohl intakte Moleküle als auch Fragmente derselben einschließen, z.B. Fab und F(ab')<sub>2</sub>. Fab und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente entbehren eines Fc-Fragments, wie etwa in einem intakten Antikörper vorhanden, so daß sie im Blutkreislauf schneller transportiert werden können und vergleichsweise weniger nicht-spezifische Gewebsbindung als intakte Antikörper aufweisen. Hierbei wird hervorgehoben, daß Fab und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern bei der Detektion und Quantifizierung von erfindungsgemäßen Proteinen eingesetzt werden können. Solche Fragmente werden typischerweise durch proteolytische Spaltung hergestellt, indem Enzyme, wie z. B. Papain (zur Herstellung von Fab-Fragmenten) oder Pepsin (zur Herstellung von F(ab')<sub>2</sub>, Fragmenten) verwendet werden.

Erfindungsgemäße Antikörper, einschließlich der Fragmente von diesen Antikörpern, können zur quantitativen oder qualitativen Detektion von erfindungsgemäßen Protein in einer Probe eingesetzt werden oder auch zur Detektion von Zellen, die erfindungsgemäße Proteine exprimieren und ggf. sekretieren. Die Detektion kann mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Verfahren erreicht werden, die Fluoreszenz-markierte Antikörper in Kombination mit

Lichtmikroskopie, Flußzytometrie oder fluorometrischer Detektion durchgeführt werden.

Erfindungsgemäße Antikörper (oder Fragmente dieser Antikörper) eignen sich für histologische Untersuchungen, wie z.B. im Rahmen der Immunofluoreszenz oder Immunoелеktromikroskopie, für die in situ Detektion eines erfindungsgemäßen Proteins. Die in situ Detektion kann dadurch erfolgen, daß eine histologische Probe von einem Patienten genommen wird und markierte erfindungsgemäße Antikörper zu einer solchen Probe hinzugegeben werden. Der Antikörper (oder ein Fragment dieses Antikörpers) wird in markierter Form auf die biologische Probe aufgetragen. Auf diese Weise ist es nicht nur möglich, die Anwesenheit von erfindungsgemäßigem Protein in der Probe zu bestimmen, sondern auch die Verteilung des erfindungsgemäßen Proteins in dem untersuchten Gewebe. Bei der biologischen Probe kann es sich um eine biologische Flüssigkeit, ein Gewebeextrakt, geerntete Zellen, wie z. B. Immunzellen oder Herzmuskel- oder Leberzellen, oder allgemein um Zellen, die in einer Gewebekultur inkubiert worden sind, handeln. Die Detektion des markierten Antikörpers kann je nach Art der Markierung durch im Stand der Technik bekannte Verfahren (z. B. durch Fluoreszenzverfahren) erfolgen. Die biologische Probe kann aber auch auf einem Festphasenträger, wie z. B. Nitrocellulose oder ein anderes Trägermaterial, aufgetragen werden, so daß die Zellen, Zellteile oder löslichen Proteine immobilisiert werden. Der Träger kann dann mit einem geeigneten Puffer ein- oder mehrfach gewaschen werden, wobei nachfolgend mit einem detektierbar markierten Antikörper nach der vorliegenden Erfindung behandelt wird. Der Festphasenträger kann dann mit dem Puffer ein zweites Mal gewaschen werden, um nicht-gebundenen Antikörper zu beseitigen. Die Menge an gebundener Markierung auf dem Festphasenträger kann dann mit einem herkömmlichen Verfahren bestimmt werden.

Als Träger eignen sich insbesondere Glas, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon-Amylasen, natürliche oder modifizierte Zellulosen, Polyacrylamide und Magnetit. Der Träger kann entweder bedingt löslichen oder unlöslichen Charakters sein, um die Bedingungen nach Maßgabe der vorliegenden Erfindung zu erfüllen. Das Trägermaterial kann beliebige Formen einnehmen, z. B. in Form von Kügelchen ("beads"), oder zylindrisch oder sphärisch sein, wobei Polystyrol-Kügelchen als Träger bevorzugt sind.

Eine detektierbare Antikörpermarkierung kann auf verschiedene Weise erfolgen. Beispielsweise kann der Antikörper an ein Enzym gebunden werden, wobei das Enzym schließlich in einem Immunoassay (EIA) eingesetzt werden kann. Das Enzym kann dann später mit einem entsprechenden Substrat reagieren, so daß eine chemische Verbindung entsteht, die auf eine dem Fachmann geläufige Art und Weise detektiert und ggf. quantifiziert werden kann, z. B. durch Spektrophotometrie, Fluorometrie oder andere optische Verfahren. Bei dem Enzym kann es sich um Malat-Dehydrogenase, Staphylokokken-Nuklease, delta-5-Steroid Isomerase, Hefe-alkohol-Dehydrogenase, alpha-Glycerophosphat-dehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase, Aspariginase, Glucoseoxidase, beta-Galactosidase, Ribonuklease, Urease, Katalase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glucoamylase oder Acetylcholinesterase handeln. Die Detektion wird dann über ein chromogenes Substrat, das spezifisch für das für die Markierung eingesetzte Enzym ist, ermöglicht und kann schließlich z.B. über Sichtvergleich des durch die Enzymreaktion umgesetzten Substrats im Vergleich zu Kontrollstandards erfolgen.

Weiterhin kann die Detektion durch andere Immunoassays sichergestellt werden, z.B. durch radioaktive Markierung der Antikörper oder Antikörperfragmente (also durch einen

Radioimmunoassay (RIA; Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T. et al. North Holland Publishing Company, New York (1978). Das radioaktive Isotop kann dabei durch die Verwendung von Szintillationszählern oder durch Autoradiographie detektiert und quantifiziert werden.

Fluoreszierende Verbindungen können gleichfalls zur Markierung eingesetzt werden, beispielsweise Verbindungen wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd und Fluorescamin. Auch fluoreszenzemittierende Metalle, wie z. B.  $^{152}\text{E}$  oder andere Metalle aus der Lanthanid-Gruppe, können eingesetzt werden. Diese Metalle werden an den Antikörper über Chelatgruppen, wie z. B. Diethylentriaminpentaessigsäure (ETPA) oder EDTA angekoppelt. Weiterhin kann der erfindungsgemäße Antikörper über eine mit Hilfe von Chemilumineszenz wirkende Verbindung angekoppelt werden. Die Gegenwart des Chemilumineszenz-markierten Antikörpers wird dann über die Lumineszenz, die im Verlauf einer chemischen Reaktion entsteht, detektiert. Beispiele für derartige Verbindungen sind Luminol, Isoluminol, Acridiniumester, Imidazol, Acridiniumsalz oder Oxalatester. Gleichmaßen können auch biolumineszente Verbindungen zum Einsatz kommen. Biolumineszenz ist eine Unterart der Chemilumineszenz, die bei biologischen Systemen vorgefunden wird, wobei ein katalytisches Protein die Effizienz der chemilumineszenten Reaktion verstärkt. Die Detektion des biolumineszenten Proteins erfolgt wiederum über die Lumineszenz, wobei als biolumineszente Verbindung beispielsweise Luciferin, Luciferase oder Aequorin in Betracht kommen.

Ein erfindungsgemäßer Antikörper kann für die Verwendung in einem immunometrischen Assay, auch bekannt als "two-site" oder "sandwich" Assay, zur Anwendung gelangen. Typische immunometrische Assay-Systeme schließen sog.

"Vorwärts"-Assays ein, die sich dadurch auszeichnen, daß erfindungsgemäße Antikörper an ein Festphasensystem gebunden sind und daß der Antikörper mit der Probe, die untersucht wird, auf diese Weise in Kontakt gebracht wird. Derart wird das Antigen aus der Probe durch die Bildung eines binären Festphasen-Antikörper-Antigen-Komplexes aus der Probe isoliert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird der feste Träger gewaschen, um den verbleibenden Rest der flüssigen Probe zu beseitigen, einschließlich des ggf. nicht gebundenen Antigens, und daraufhin mit einer Lösung in Kontakt gebracht, die eine unbekannte Menge an markiertem Detektionsantikörper enthält. Der markierte Antikörper dient hierbei als sog. Reporter-Molekül. Nach einer zweiten Inkubationszeit, die es den markierten Antikörper erlaubt, mit dem an die Festphase gebundenen Antigen zu assoziieren, wird der Festphasenträger erneut gewaschen, um markierte Antikörper, die nicht reagiert haben, zu beseitigen.

In einer alternativen Assay-Form kann auch ein sog. "sandwich"-Assay zum Einsatz kommen. Hierbei kann ein einziger Inkubationsschritt ausreichen, wenn der an die Festphase gebundene Antikörper und der markierte Antikörper beide gleichzeitig auf die zu testende Probe aufgebracht werden. Nach Abschluß der Inkubation wird der Festphasenträger gewaschen, um Rückstände der flüssigen Probe und der nicht-assoziierten markierten Antikörper zu beseitigen. Die Anwesenheit von markiertem Antikörper auf dem Festphasenträger wird genau so bestimmt, wie bei den konventionellen "Vorwärts"-Sandwich-Assay. Bei dem sog. reversen Assay wird schrittweise zunächst eine Lösung des markierten Antikörpers zur Flüssigprobe hinzugefügt, gefolgt von der Beimischung von nicht-markiertem Antikörper, gebunden an einen Festphasenträger, nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit. Nach einem zweiten Inkubationsschritt wird der Festphasenträger in herkömmlicher Weise gewaschen, um ihn von Probenüberresten und von markiertem Antikörper, der nicht

reagiert hat, zu befreien. Die Bestimmung des markierten Antikörpers, der mit dem Festphasenträger reagiert hat, wird dann, so wie oben beschrieben, durchgeführt.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei die Wirtszellen mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert und dann unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen  
10 kultiviert werden, so daß das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt werden kann (Anspruch 15). Das Protein der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz kann dabei, abhängig von dem Expressionssystem, aus einem Kulturmedium oder aus Zellextrakten isoliert werden. Der Fachmann kann  
15 ohne weiteres erkennen, daß die jeweiligen Isolierungsmethoden und das Verfahren bei der Aufreinigung des von einer erfindungsgemäßen DNA codierten, rekombinanten Proteins stark vom Typ der Wirtszelle oder auch von dem Umstand, ob das Protein in das Medium  
20 sekretiert wird, abhängt. Zum Beispiel können Expressionssysteme eingesetzt werden, die zur Sekretion des rekombinanten Proteins führen. Das Kulturmedium muß in diesem Fall durch kommerziell erhältliche Proteinkonzentrationsfilter, z.B. Amicon oder Millipore  
25 Pelicon, aufkonzentriert werden. Nach dem Konzentrationsschritt kann ein Reinigungsschritt erfolgen, z.B. ein Gelfiltrationsschritt. Alternativ kann aber auch ein Anionenaustauscher eingesetzt werden, der eine Matrix mit DEAE aufweist.

30

Als Matrix dienen dabei alle aus der Proteinreinigung bekannten Materialien, z.B. Acrylamid oder Agarose oder Dextran oder ähnliches. Es kann aber auch ein Kationenaustauscher eingesetzt werden, der dann typischerweise  
35 Carboxymethyl-Gruppen enthält. Zur weiteren Reinigung eines durch eine erfindungsgemäße DNA codierten Proteins

können dann HPLC-Schritte dienen. Es kann sich um einen oder mehrere Schritte handeln. Insbesondere wird die "Reversed- Phase"-Methode eingesetzt. Diese Schritte dienen zum Erhalt eines im wesentlichen homogenen rekombinanten Proteins einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.

Neben bakteriellen Zellkulturen zur Isolierung des Genprodukts können auch transformierte Hefezellen eingesetzt werden. In diesem Fall kann das translatierte Protein sekretiert werden, so daß die Proteinreinigung vereinfacht wird. Sekretiertes rekombinantes Protein aus einer Hefewirtszelle kann durch Methoden erhalten werden, wie sie bei Urdal et al. (J. Chromato. 296:171 (1994)) offenbart sind.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei Wirtszellen mit einem Expressionsvektor, der eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz enthält, transformiert werden (Anspruch 17). Dieses Verfahren zur Expression von Genprodukten, die auf einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz beruhen, dient nicht dazu, das entsprechende Genprodukt zu konzentrieren und aufzureinigen, sondern vielmehr dazu, den Zellstoffwechsel durch das Einführen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen über die Expression des dazugehörigen Genprodukts zu beeinflussen. Hier ist insbesondere an die Verwendung der mit Hilfe von Expressionsvektoren transformierten Wirtszellen zum Zwecke der Ausschaltung der inflammatorischen Reaktion zu denken. Durch die Verwendung eines sogenannten konstitutiven Promotors können in diesen Zellen gleichbleibende Konzentrationen von auf erfindungsgemäßen Sequenzen beruhenden Proteinen exprimiert werden. Auf diese Weise wird dauerhaft die Auslösung der Inflammation unterbunden.

Die entsprechenden Zelllinien werden dadurch gegenüber einer Vielzahl von inflammatorischen Stimulanzen resistent. Diese modifizierten Zellen können auch  
5 gegebenenfalls wieder in den Säuger- oder humanen Organismus rücküberführt werden. Auf diese Weise wird durch in vitro mit den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren manipulierter Zellen und die anschließende Übertragung (Transplantation) in den  
10 Organismus ein gentherapeutischer Einsatz der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen möglich. Dabei werden Expressionsvektoren mit den erfindungsgemäßen Sequenzen vorzugsweise in solche Zellen transfiziert, die im Organismus einer Fehlsteuerung der Inflammation  
15 anheimfallen (bspw. Hepatocyten bei chronischer Leberentzündung). Insbesondere werden in einem solchen gentherapeutischen Ansatz erfindungsgemäße Sequenzen eingesetzt, die das inflammatorische Signal blockieren, bspw. Fragmente, die das inflammatorische Signal nicht  
20 weitertragen und damit die Signaltransduktion unterbrechen.

Mit dem vorliegenden Erfindungsgedanken geht aber auch ein gentherapeutisches Verfahren, das in vivo durchgeführt werden kann, einher. Zu diesem Zwecke werden Vektoren  
25 eingesetzt (z.B. Liposomen, Adenoviren, Retroviren oder ähnliche oder auch nackte DNA), die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen gezielt in die gewünschten Zielzellen des Organismus insertieren. Bei den Zielzellen handelt es sich  
30 typischerweise um Zellen, deren Inflamationsregulation gestört ist, insbesondere um Zellen, die pathologisch eine verstärkte Disposition zur Entzündungsreaktion zeigen (bspw. bei chronischer Leberentzündung). In diesem Zusammenhang können Fragmente einer erfindungsgemäßen DNA-  
35 Sequenz zum Einsatz kommen, die inhibitorische Wirkung entfalten, bspw. DNA-Sequenzen, die im wesentlichen nur

die PYD-Domäne enthalten und damit nur noch eine  
Assziierungsfunktion wahrnehmen können, nicht aber  
weitergehend biologische Signale (zur Inflammation)  
weitergeben können - also keine weitere biologische  
5 Funktionalität aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist  
die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz  
(Allele, Derivate, Fragmente) oder eines  
10 erfindungsgemäßen Genprodukts zur Behandlung von  
Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer  
Signaltransduktion beruhen (Anspruch 17). Die vorgenannte  
erfindungsgemäße Verwendung von DNA-Sequenzen schließt  
auch die Verwendung von oben beschriebenen  
15 erfindungsgemäßen Expressionsvektoren ein, die eine  
erfindungsgemäße Nukleotidsequenz, bspw. eine in Fig. 1  
offenbarte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles  
Derivat oder Allel einer solchen Sequenz (oder auch ein  
infunktionelles Derivat einer solchen Sequenz) aufweisen,  
20 mit dem Ziel, die fehlgeleitete intrazelluläre  
Signaltransduktion zu korrigieren. Die Verwendung kann  
nach gentherapeutischen Verfahren über Injektion von  
nackter erfindungsgemäßer DNA oder dem Protein oder über  
Genfähren, insbesondere virale oder liposomale Vektoren,  
25 erfolgen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind  
daher sowohl die Verwendung derartiger erfindungsgemäßer  
Expressionsvektoren sowie die erfindungsgemäße Verwendung  
von Zellen (d.h. die Verwendung zur Auslösung (oder zur  
Blockade) des Inflammationsgeschehens), die mit  
30 erfindungsgemäßen Expressionsvektoren transfiziert sind.

Im einzelnen läßt sich feststellen, daß derartige  
Gentherapieansätze sich bereits als wirksam bei der  
Therapie von genetisch bedingten Erkrankung,  
35 beispielsweise bei der Bluterkrankheit, und auch bei der  
Behandlung anderer genetischer Erkrankung, wie

beispielsweise cystischer Fibrose, sich als wirksam erwiesen haben. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Nukleotidsequenz erfindungsgemäßer Art, beispielsweise eine Nukleotidsequenz gemäß den in Figur 1

5 enthaltenen Nukleotidsequenzen oder eine Variante (Derivat, Fragment (vor allem mindestens 100 Basen umfassen, oder Allel) dieser Sequenz in einen geeigneten Vektor überführt, der die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in die Säugetierzellen, vorzugsweise

10 Humanzellen, einschleust. Besonders geeignete Transfektionsvektoren für diese Anwendung sind Retroviren und Adenoviren. Alternativ können auch erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen in einem molekularen Konjugat mit einem Virus (beispielsweise einem Adenovirus) oder mit

15 viralen Komponenten (beispielsweise Capsidproteinen) komplexiert sein. Geeignete Methoden für die Bildung derartiger Vektoren sind im Stand der Technik wohl bekannt, wobei beispielsweise auf die Offenbarung in "Working toward Human Genetherapy", Kapitel 28 ( in

20 Recombinant DNA, Second Edition, Watson GD et al, New York: Scientific American Books, S. 567 - 581, 1992) verwiesen wird. Bei einem derartigen gentherapeutischen Verfahren werden mit erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen transfizierte Vektoren in Zellen oder Geweben

25 vorzugsweise durch Injektion, Inhalation, orale Einnahme oder Aufnahme durch Schleimhäute dem betroffenen Patienten verabreicht. Ein derartiger Versuchsansatz wird im allgemeinen als in-vitro-Gentherapie bezeichnet. Alternativ können Zellen oder Gewebe, beispielsweise

30 hämatopoietische (Stamm)zellen aus dem Knochenmark oder andere adulte Stammzellen (vor allem Gewebespezifische Stammzellen), dem betroffenen Patienten entnommen werden und nach Maßgabe der im Stand der Technik bekannten Verfahren in-vitro kultiviert werden. Die entsprechend

35 ausgestalteten Vektoren mit den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen werden dann in-vitro den Zellen oder

Gewebe zugegeben, wobei vorzugsweise die Inkorporation derartiger Vektoren in die Zellen durch Elektroporation erfolgt. Die derart modifizierten Zellen oder Gewebe werden schließlich dem betroffenen Patienten  
5 reimplantiert. Derartige gentherapeutische Verfahren werden als ex-vivo-Gentherapie bezeichnet. Für beide gentherapeutische Ansätze, also in-vivo- oder ex-vivo-Verfahren, können erfindungsgemäße Nukleotidsequenzen operativ mit einer regulatorischen DNA-Sequenz verbunden  
10 werden, wobei es sich auch um eine heterologe regulatorische DNA-Sequenz handeln kann, so daß ein rekombinantes Konstrukt in der transfizierten Zelle vorliegt. Dieses Konstrukt kann dann in den Vektor insertiert werden und schließlich direkt dem betroffenen  
15 Patienten in einem in-vivo-Gentherapieansatz bzw. den Zellen oder Geweben des betroffenen Patienten in einem ex-vivo-Gentherapieansatz zugeführt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das genetische Konstrukt in die Zellen oder die Gewebe des Tieres,  
20 entweder in-vivo- oder ex-vivo in einem molekularen Konjugat mit einem Virus, (beispielsweise einem Adenovirus oder viralen Komponenten (beispielsweise viralen Capsid-Proteinen) zugeführt werden. Die oben beschriebenen gentherapeutischen Ansätze können entweder  
25 (a) zu einer homologen Rekombination zwischen der Nukleotidsequenz und dem infunktionellen Gen in den Zellen des betroffenen Tieres oder (b) zu einer zufälligen Insertion des Gens an einer beliebigen Stelle im Wirtszellgenom oder (c) zur Inkorporation des Gens in  
30 den Zellkern führen, wobei es dann als extrachromosomales genetisches Element vorliegen kann. Die Offenbarung derartiger Verfahren und Ansätze zur Gentherapie können dem US-Patent US 5,578,461, der WO 94/12650 und der WO 93/09222 entnommen werden, die  
35 Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind. Die transfizierten Wirtszellen, die homolog oder

heterolog sein können, können mit einer semipermeablen Schicht eingehüllt werden und derart in die betroffenen Patienten reimplantiert werden, wobei auf diese Weise ein Angriff des Immunsystems des Patienten auf die reimplantierten Zellen verhindert wird (siehe WO 5 93/09222).

Bevorzugt ist dabei die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder eines 10 erfindungsgemäßen Genprodukts, wenn es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt (Anspruch 18). Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung einer solchen DNA-Sequenz oder eines solchen Genprodukts zur Behandlung (zur 15 Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung) von Psoriasis, Arteriosklerose, bakteriellen oder viralen Infektionserkrankungen, insbesondere bakterieller oder viraler Meningitis oder bakterieller Pneumonie, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Asthma, Sarkoidose, 20 glomerulärer Nephritis oder Osteoarthritis (Anspruch 19). Dies kann bspw. durch Fragmente erreicht werden, die die Signaltransduktion blockieren, bspw. um Sequenzen, die nur für die PYD-Domäne (oder Teile hiervon) codieren bzw. nur diese enthalten.

25 Gemäß einem weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird eine Verbindung zur Verfügung gestellt, die dadurch gekennzeichnet, daß sie die Funktion der erfindungsgemäßen Genprodukte (Proteine) als intrazelluläres Signalmolekül einer inflammatorischen 30 Signalkaskade zur Auslösung von Entzündungsreaktionen inhibiert. Insbesondere blockieren erfindungsgemäße Verbindungen die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung (Anspruch 20). Bevorzugt handelt es sich bei einer erfindungsgemäßen 35 chemischen Verbindung, die die erfindungsgemäße PYD-Funktion (bspw. bei Inflammation oder Apoptose)

blockiert, um ein Oligopeptid, das chemisch modifiziert (bspw. zur erleichterten Passage durch die Zellmembran, insbesondere durch endständige (vor allem N-terminale) Sequenzbereiche) sein kann oder nicht-modifiziert sein kann. Insbesondere kann es sich um einen an der PYD-Assoziierung beteiligten nativen Sequenzbereich eines erfindungsgemäßen Proteins handeln. Zu nennen wären bspw. sog. DN-Varianten (bspw. die AS 1 bis 94 von humanem Pycard oder entsprechende PYD-Domänen von NALP-Proteinen (s. Figur 1)), die bspw. auch die nachfolgend beschriebenen gentherapeutischen Verfahren verabreicht werden können. Derartige DN-Varianten können auch ausschließlich die NAD-Domäne oder einen Teil derselben oder eine die LRR-Domäne oder einen Teil derselben oder eine CARD-Domäne oder einen Teil derselben enthalten und auf diese Weise dominant negativ die Signalkaskade, insbesondere inflammatorische Signalkaskaden blockieren. Weiter unten sind die medizinischen Indikationen für Verwendung (Arzneimittelherstellung) derartiger DN-Varianten nativer erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart. Erfindungsgemäß werden somit Sequenzen einzelner Domänen (LRR, PYD, CARD, NAD) erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart.

Damit kann bspw. ein erfindungsgemäße inhibitorisches Molekül, vorzugsweise ein Tetra- bis Dodekamer, eine dem nativen Substrat entsprechende Aminosäuresequenz enthalten oder aus einer nativen Substratsequenz bestehen, wobei das vorzugsweise Tetra- bis Dodekamer typischerweise auch einen Sequenzabschnitt aus einer PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins aufweist. Ggf. kann ein derartiges Oligopeptid auch dadurch chemisch modifiziert sein, daß die amidartige Bindung zwischen den einzelnen Aminosäuren durch eine gegen proteolytischen Abbau resistente alternative chemische Gruppe (bspw. Schwefel- oder Phosphorbrücken) ersetzt wird.

Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung ist vorzugsweise eine organisch-chemische Verbindung mit

einem Molekulargewicht von <5000, insbesondere <3000, vor allem <1500 und ist typischerweise physiologisch gut verträglich (Anspruch 21). Ggf. wird sie Bestandteil einer Zusammensetzung mit mindestens einem weiteren  
5 Wirkstoff sowie vorzugsweise Hilfs- und/oder Zusatzstoffen sein und als Arzneimittel eingesetzt werden können. Besonders bevorzugt wird das organische Molekül dann sein, wenn die Bindungskonstante für die Bindung an ein erfindungsgemäßes Protein, insbesondere an die  
10 Domäne PYD eines erfindungsgemäßen Proteins, mindestens  $10^7 \text{ mol}^{-1}$  beträgt. Die erfindungsgemäße Verbindung wird vorzugsweise so beschaffen sein, daß sie die Zellmembran passieren kann, sei es durch Diffusion oder über (intra)membranöse Transportproteine (Anspruch 22).

15

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die erfindungsgemäße Verbindung ein Antikörper, vorzugsweise ein gegen die PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins gerichteter  
20 Antikörper, der ex vivo in retransplantierte Wirtszellen oder durch gentherapeutische in vivo Verfahren in Wirtszellen eingeschleust wird und dort als "intrabody" nicht sekretiert wird, sondern intrazellulär seine Wirkung entfalten kann. Durch derartige erfindungsgemäße  
25 "Intrabodies" sind die Zellen vor einer inflammatorischen Reaktion geschützt. Eine derartige Vorgehensweise wird typischerweise für Zellen jener Gewebe in Betracht kommen, die beim Patienten eine pathophysiologisch übersteigertes inflammatorisches Verhalten zeigen, also  
30 bspw. bei Hepatocyten (Leberentzündung), Keratinozyten, Bindegewebszellen, Immunzellen oder Muskelzellen. Entsprechend sind auch derartig mit erfindungsgemäßen "Intrabodies" gentherapeutisch modifizierte Zellen Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

35

Im einzelnen eignen sich erfindungsgemäße Antikörper gegen erfindungsgemäße Aminosäuresequenzen, insbesondere

erfindungsgemäße Antikörper, die gegen eine PYD-Domäne gerichtete sind, dann besonders, wenn sie beispielsweise als "single-chainFv" (scFv) oder Fab-Fragmente vorliegen und zur Erkennung der Zielstruktur (bspw. der PYD-Domäne) in verschiedene subzelluläre Kompartimente geleitet werden können, um dort die Aktivität des Zielmoleküls entweder direkt oder indirekt durch Interferenz mit den subzellulären Transportwegen zu blockieren. Beispielsweise kann für eine zielgerichtete subzelluläre Positionierung des Intrabodies ein ER-Retensionssignal (KDEL) an den C-Terminus des Antikörperfragments mit einer sogenannten "Leader-Sequenz" angehängt werden, was zu einer Retention im Lumen des endoplasmatischen Retikulums führt. Durch eine entsprechende mitochondriale Leadersequenz, beispielsweise der Cytochrom C-Oxidaseeinheit VIII, kann ein Transport in die Mitochondrien erreicht werden. Die cytoplasmatische Expression des Antikörpers wird dadurch sichergestellt, daß die Expression der Antikörperfragmente ohne irgendeine Signal- oder Leader-Sequenz erfolgt. Auch ein Transport in den Nukleus ist möglich, indem zum Beispiel vom großen SV 40 T-Antigen eine nukleäre Lokalisationssequenz gewählt wird (PKKKRKV), und zwar entweder am N- oder C-Terminus. Entsprechende technische Maßnahmen müssen eingesetzt werden, um die Expression im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas unter Ausbildung von Disulfid-Brücken sicherstellen zu können. Die nachfolgenden Veröffentlichungen aus dem Stand der Technik werden inhaltlich explizit in die vorliegende Offenbarung miteinbezogen (Marasco, 1997, Gene Therapy. 4, 11-15; Richardson, & Marasco, 1995, Trends Biotechnology 13, 306 - 310; Biocca und Cattaneo 1995, Trends Cell Biology 5, 248 - 252; Biocca et al, 1995, Bio/Techn. 13, 1110-1115, Biocca et al, 1990, EMBO Journal 9, 101 - 108; Piche et al, 1998, Cancer Research 58, 2134 - 2140; Rosso et al, 1996, Biochem. Biophys. Res. Communication 220, 255 bis 263).

Als weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen (bspw. zur Inhibition von molekularen Mechanismen, die für überschießende Entzündungsereignisse ursächlich sind) kommen auch Sequenzen (DNA oder RNA) in Betracht, die im Zusammenhang mit anti-sense Technologien stehen. In diesem Fall werden antisense DNA oder RNA in Zellen eingeschleust (bspw. durch gentherapeutische Ansätze, bspw. Verwendung rekombinanter Viren, s.o.) und diese können auf diese Weise durch komplementäre Bindung transkribierter mRNA (für erfindungsgemäße PYD-Domänen enthaltende Proteine) die Translation der dazu gehörigen polymorphen genomischen Sequenz blockieren. Eine derartige Vorgehensweise ist insbesondere bei Patienten deren Expressionsniveaux von PYD-Domänen enthaltenden Proteinen pathologisch erhöht ist, relevant.

Weitere Verbindungen bzw. Therapieverfahren zur Behandlung der offenbarten medizinischen Indikationen (bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels) beruhen auf Ribozym-Methoden. Hierzu werden Ribozyme verwendet, die eine Ziel-mRNA schneiden können. Im vorliegenden Fall werden daher Ribozyme offenbart, die native mRNA von erfindungsgemäßen Proteinen (bspw. NALP1 oder anderen PYD-Domänen enthaltenden Proteinen) spalten können. Erfindungsgemäße Ribozyme müssen dabei mit der erfindungsgemäßen Ziel-mRNA interagieren können, bspw. über Basenpaarung, und anschließend die mRNA spalten, um die Translation von bspw. NALP1 oder Pycard zu blockieren. Die erfindungsgemäßen Ribozyme werden über geeignete Vektoren in die Zielzellen geschleust (insbesondere Plasmide, modifizierte Tierviren, insbesondere Retroviren), wobei die Vektoren neben ggf. anderen Sequenzen eine cDNA -Sequenz für ein erfindungsgemäßes Ribozym aufweist.

Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung mit der Funktion der Blockade der bspw. inflammatorischen

Funktion von erfindungsgemäßen physiologischen Proteinen (s. Fig. 1) kann als Arzneimittel Verwendung finden. Insbesondere ist eine erfindungsgemäße chemische Verbindung (zur Herstellung eines Arzneimittels) zur  
5 Behandlung von Erkrankungen, für die zumindest tw. eine pathologische hyperinflammatorische Reaktion kausal oder symptomatisch ist, geeignet. Damit kann ein erfindungsgemäßer Inhibitor der zellulären Funktion eines erfindungsgemäßen Proteins, also bspw. der  
10 inflammatorischen Reaktion, insbesondere ein Inhibitor der Assoziierung von PYD-Domänen, zur Inflammationsinhibition ganz besonders bei der Behandlung der folgenden Erkrankungen bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der folgenden Erkrankungen  
15 eingesetzt werden: Autoimmunerkrankungen, Psoriasis, Arteriosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose,  
20 glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis, Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Anspruch 23).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren ("Screening-Methoden") zur Identifizierung von Verbindungen (organisch-chemischen Verbindungen,  
25 Biomoleküle (bspw. Oligonukleotide, Antikörper oder Antikörperfragmente, Oligopeptide, Ribozyme, DN-Mutanten von erfindungsgemäßen Proteinen) mit inhibitorischen Eigenschaften in Hinblick auf die Auslösung oder Weiterleitung von Signalen, die mit inflammatorischen  
30 Reaktionen in Zusammenhang stehen, insbesondere von Verbindungen die die Interaktion von Proteinen der inflammatorischen Signalkaskade, insbesondere von physiologisch miteinander reagierenden PYD-Domänen (gleicher oder verschiedener Proteine) blockieren (bspw.  
35 die Assoziierung des Inflammosoms blockieren, indem bspw. die Assoziierung von NALP1 und Pycard inhibiert wird).

Andere erfindungsgemäße Angriffspunkte der Interaktion sind bspw. die Inhibition der Interaktion zwischen der CARD-Domäne von Caspase-1 und der CARD-Domäne von Pycard oder die Inhibition der Interaktion der CARD-Domäne von  
5 Caspase-5 und NALP1. Schließlich kann es auch bevorzugt sein, dass erfindungsgemäße Verbindungen die Wechselwirkung der LRR-Domäne von Proteinen der NALP-Klasse, bspw. NALP1, mit weiter stromaufwärts liegenden Proteinen oder Stimuli, modulieren (blockieren oder  
10 aktivieren). Ggf. können auch Verbindungen, die als Aktivatoren der vorgenannten Interaktionen wirken, bevorzugt sein.

Erfindungsgemäße Verfahren sehen vor, daß (a) Zellen, vor allem Hepatocyten, insbesondere T-Lymphozyten, so  
15 modifiziert werden, daß sie eine inflammatorische Reaktion zeigen, (b) diese gemäß (a) modifizierten Zellen in einer Zellkultur bereitgestellt werden, (c) Testsubstanzen zur Zellkultur zugegeben werden, (d) die das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion der Zellen in  
20 der Zellkultur bestimmt wird. Hierzu werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise mehrere parallele Versuche mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz angesetzt, um im Falle einer die Inflammation inhibierenden Wirkung der Testsubstanz deren  
25 ID<sub>50</sub>-Wert bestimmen zu können.

Alternativ kann ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung der vorgenannten Verbindungen auch die folgenden Schritte umfassen: (a) ein in vitro Testsystem bereitgestellt wird, das mindestens eine erfindungsgemäße  
30 DNA-Sequenz enthält, (b) in Form eines Hochdurchsatz-"Screenings" potentielle Wirkstoffsubstanzen dem gemäß (a) bereitgestellten in vitro Testsystem zugeführt werden, und (c) ein physikalisches, chemisches oder biologisches Signal in dem Testsystem zur Identifikation von  
35 Wirkstoffsubstanzen detektiert wird. Chemische Bibliotheken können durchsucht werden, und zwar sowohl

nach aktivierenden oder inhibierenden Substanzen. In diesem Zusammenhang wird auf die Offenbarung des Lehrbuchs von Böhm, Klebe und Kubinyi (Wirkstoffdesign, 1996, Spektrum-Verlag, Heidelberg) verwiesen, auf das diesbezüglich vollinhaltlich Bezug genommen wird. Insbesondere können Verbindungen, die einem der vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert werden, auch geeignet sein, das Expressionsniveau des nativer erfindungsgemäßer Sequenzen, bspw. von Pycard oder NALP1, beeinflussen. Der Wirkungsmechanismus kann auf einer Beeinflussung bspw. der Aktivität des nativen Promotors beruhen, so dass die Transkriptionsaktivität moduliert wird.

Ein erfindungsgemäßes "Screening"-Verfahren kann auch mit Hilfe von sogenannten "Proteomics"-Techniken durchgeführt werden. Hierzu werden zur Bestimmung eines Standards typische Unterschiede im Expressionsmuster von Zellen mit inflammatorischer Reaktion und Kontrollzellen experimentell erhoben. Methodisch wird für ein derartiges Verfahren typischerweise die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Testsubstanzen, die das Expressionsmuster erfindungsgemäßer Substanzen verändern, können dann auf Grund der veränderten Expressionsmuster erkannt werden (s. auch die Offenbarung bei Rehm, H., Der Experimentator, Spektrum-Verlag, 2000)

Über Strukturanalysen eines erfindungsgemäßen Proteins lassen sich gezielt außerdem erfindungsgemäße Verbindungen finden, die eine spezifische Bindungsaffinität aufweisen (Rationales Drug Design (Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg)). Hier wird die Struktur oder eine Teilstruktur, Derivat, Allel, Isoform oder ein Teil einer solchen von einem der erfindungsgemäßen Proteine über NMR- oder Röntgenkristallographie-Verfahren (nach entsprechender Kristallisierung, z.B. nach der Methode des „hängenden Tropfens“) ermittelt oder, sofern eine

solche hochaufgelöste Struktur nicht vorliegt, mit Hilfe von Strukturvorhersage-Algorithmen ein Strukturmodell eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. auch mit Hilfe von homologen bereits strukturell aufgeklärten Proteinen (z.B. von Rhodopsin), erstellt, und diese(s) benutzt, um mit Unterstützung von Molecular Modelling Programmen Verbindungen, die als Agonisten oder Antagonisten wirken können, zu identifizieren, für die sich eine hohe Affinität zum erfindungsgemäßen Protein vorhersagen läßt.

5 Ggf. lassen sich die oben bezeichneten Verfahren zur Strukturaufklärung auch miteinander kombinieren. Geeignete Kraftfelder werden zur Simulation der Affinität einer potentiell affinen Verbindung an eine interessante Substruktur eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. das aktive Zentrum, eine Bindungstasche oder eine „hinge“-Region, eingesetzt. Diese Substanzen werden dann synthetisiert und in geeigneten Testverfahren auf ihr Bindungsvermögen und ihre therapeutische Nutzbarkeit getestet. Derartige in silico Verfahren zur

10 Identifizierung potentieller Wirkstoffe, die ihre Wirkung durch Bindung an erfindungsgemäße PYD-Domänen-Proteine entfalten, sind gleichfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15 Ferner werden auch, insbesondere in-vitro Verfahren offenbart, die es erlauben, nativ auftretende Polymorphismen der erfindungsgemäßen Proteine zu identifizieren. Für derartige Verwendungszwecke eignen sich insbesondere PCR-Methoden, insbesondere auch RT-PCR-

20 Verfahren, also die Diagnose auf der Basis von mRNA, die in vitro entsprechend in cDNA übersetzt wird und dann mit Hilfe von herkömmlichen PCR-Verfahren vervielfältigt wird. Auch entsprechende Array-Techniken, die erfindungsgemäße Oligonukleotide auf einem Chip

25 positionieren, erlauben die Diagnostik mit Hilfe von Hybridisierungsreaktionen. Hierbei wird die Patientenprobe gegen einen Array mit erfindungsgemäßen Oligonukleotiden, die die erfindungsgemäßen

30  
35

Polymorphismen einschließen, getestet. Positive Signale auf dem Array bei Oligonukleotiden, die mit Entzündungserkrankungen gekoppelte Polymorphismen aufweisen, lassen eine entsprechende Diagnose zu.

5 Schließlich sind Oligopeptide Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mindestens 20, stärker bevorzugt mindestens 30 und noch stärker bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren umfassende Teilabschnitte der gemäß Figur 1  
10 offenbarten Proteinsequenzen, insbesondere Sequenzen mit den Nummern 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, ..., 1.20. Derartige Teilsequenzen können nach dem Fachmann geläufigen Verfahren bspw. chemisch synthetisiert werden und können vorzugsweise als Antigene für die Produktion von  
15 Antikörpern eingesetzt werden. Vorzugsweise wird es sich bei diesen Teilabschnitten von erfindungsgemäßen Proteinen bzw. deren Derivaten, Allelen oder Fragmenten offenbarten Sequenzen handeln, die im räumlichen Modell der Proteine solche Regionen besetzen, die zumindest teilweise die Proteinoberfläche ausmachen. Bevorzugte  
20 Teilsequenzen von mindestens 20 AS Länge werden zumindest tw. die PYD-Domäne (s. Figur 7) (oder im Falle der Proteine der Klasse der NALP-Proteine die NAD-Domäne) der erfindungsgemäßen Proteine umfassen, insbesondere bevorzugt wird ein erfindungsgemäßer Teilabschnitt  
25 mindestens 20 AS lange Peptide einer der erfindungsgemäßen Sequenzen gemäß Figur 7 zwischen Position 1 und Position 30 (gemäß Figur 7) aufweisen, bspw. das Peptid LENLPAEELKKFKLKL SVPL (Position 1 bis  
30 21, 21 AS Länge von humanem Pycard) oder die entsprechenden aus Figur 7 entnehmbaren Sequenzen der weiteren erfindungsgemäßen Sequenzen, insbesondere aus der Klasse der NALP-Proteine.

35 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 stellt DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) dar, die an der inflammatorischen Signalkaskade beteiligt sind.

5 Fig. 2 zeigt eine Zusammenfassung der vorgenannten Sequenzen in tabellarischer Form, geordnet nach den in Fig. 1 bereits verwendeten Bezeichnungen, wobei etwaige EST-Klone, die Herkunft der Sequenz, die Lokalisierung auf einem Chromosom sowie eine Zusammenfassung der in den  
10 jeweiligen Sequenzen enthaltenen Domänen (z. B. die PYD-Domäne, SPRY-Domäne, CARD-Domäne, NACHT-Domäne, die LRR-Domäne) angegeben sind. Unter (A), (B) und (C) sind die Sequenzen humanen Ursprungs zusammengefaßt, (D) enthält dagegen murine Sequenzen.

15

Fig. 3 zeigt das generalisierte "PYD"-Suchprofil, das eingesetzt wurde, um weitere PYD-Proteine in bspw. EST-Datenbanken aufzufinden. Hierbei wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem.,  
20 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der vorliegenden Anmeldung sind. Hierdurch wurden zwei weitere PYD-enthaltende Proteine identifiziert, nämlich  
25 NALP1 und NALP2 (die Bezeichnung NALP setzt sich aus den einzelnen in beiden Proteinen auftretenden charakteristischen Domänen zusammen: Domäne NACHT, LRR und PYD). Beide Proteine spielen eine entscheidende Rolle als Signaltransduktionsproteine für inflammatorische  
30 Signale. Des weiteren kommt auch deren Funktion und damit Verwendung im Zusammenhang mit der apoptotischen Signalproteintransduktion in Betracht.

Im Ergebnis zeigt Fig. 4, daß Pycard mit Hilfe seiner  
35 PYD-Domäne homodimerisiert und mit der PYD-Domäne von NALP1 interagiert. In der mittleren Darstellung wurden Zellextrakte, lysiert 24 Stunden nach der Transfektion, herangezogen und die anti-Flag-Immunopräzipitate auf die

Anwesenheit von VSV-Pycard untersucht. In der unteren Darstellung wurden die verschiedenen Flag-markierten Konstrukte (nämlich Pycard-PYD (also PYD von Pycard)), RAIDD, Apafl-CARD (CARD von Apafl, NALP1-PYD (PYD von NALP1), NALP1-CARD (CARD von NALP1) und ein Scheinvektor, in Hinblick auf ihre jeweilige Anwesenheit im Immunopräzipitat durch anti-Flag-Antikörper untersucht.

Fig. 5 zeigt im Teil A eine Ausrichtung von PYD-Domänen aus verschiedenen Proteinen ("alignment" vom N-Terminus zum C-Terminus). Die jeweiligen Sequenzpositionen mit einer mindestens 50%igen Identität bzw. mit zumindest ähnlichen Aminosäuren sind schwarz bzw. mit grauem Hintergrund unterlegt. Die Abkürzungen stehen für HS: homo sapiens und DR: Danio rerio (Zebrafisch). Die jeweiligen Zugangsnummern bei der Datenbank "Gen Bank" (EMBL) sind die folgenden: AF310103 für humanes Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1, AF310106 für NALP2, AAF66964 für das Protein CASPY vom Zebrafisch, AAF66956 für das Protein Pycard vom Zebrafisch.

Fig. 5B stellt in schematischer Weise die Domän-Struktur von Proteinen mit einer PYD-Domäne (Pyrin-Domäne) dar. Die Namensgebung für die einzelnen Homologiedomänen ist zu entnehmen der Figurenlegende in Anlage A12 unter Fig. 5.

Fig. 5C stellt die Aminosäuresequenz von NALP1 dar. Die verschiedenen Schattierungen entsprechen den für Fig. 5B gewählten domänenspezifischen Schattierungen: dunkelgrauer Hintergrund: PYD-Domäne, eingerahmter heller Hintergrund NALP1-Domäne, hellgrauer Hintergrund: LRR-Domäne und dunkler Hintergrund: CARD-Domäne.

Fig. 6 stellt eine Ausrichtung ("alignment") von repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD-Domäne) Todeseffektordomäne (DED) und Caspase-Rekrutierungsdomän

(CARD) und Todesdomäne (DD) dar. Die Ähnlichkeit der verschiedenen Domänen wird durch korrespondierende Aminosäuren, die schattiert dargestellt sind, deutlich. Auch auf dem Niveau der Sekundärstruktur gibt es erhebliche Ähnlichkeiten, wie durch die Sekundärstruktur-Vorhersage (hier für jeweils 6  $\alpha$ -Helices) deutlich wird.

Fig. 7 stellt eine Ausrichtung (vom N- zum C-Terminus, "alignment") von Aminosäuresequenzen der PYD-Domänen der folgenden Proteine dar: Pyrin, vom Menschen (hs), von der Maus (mm) und rn, Pycard vom Menschen und von der Maus menschliches Pyc, menschliches NALP1, menschliches NALP2, menschliches NALP3, menschliches NALP4, menschliches NALP5, menschliches NALP6, menschliches NALP7, menschliches NALP8, menschliches NALP9, menschliches NALP10, menschliches NALP11, murines NALP12, menschliches NALP13, murines NALP14, menschliches NALP15, menschliches PY10, murines PY16, CASPY1 vom Zebrafisch, CASPY2 vom Zebrafisch, Pycard vom Zebrafisch. In der letzten Zeile ist eine Hervorhebung der in einer Consensus-Sequenz auftretenden Sequenzposition markiert.

Fig. 8 stellt einen Stammbaum der identifizierten PYD-Domänen enthaltenden Proteine dar, wobei die Nähe des Verwandtschaftsgrades in diesem Stammbaum berücksichtigt ist. Damit zeigt der Stammbaum die vermeintliche Divergenz von durch genomischen evolutionär bedingten Duplizierungen erhaltenen Stammbaums.

Figur 9 zeigt, daß Pycard und NALP1 assoziieren und proinflammatorische Caspasen aktivieren können. Figur 9a stellt hierbei in schematisierter Form die Domänenstruktur von Apaf-1, NOD1, erfindungsgemäßem NALP1 und erfindungsgemäßem Pycard (Asc) dar. Die beiden aus dem Stand der Technik bekannten Proteine Apaf-1 und NOD1 weisen eine strukturelle Verwandtschaft mit den erfindungsgemäßen Proteinen auf. Hierbei sind die einzelnen Domänen mit Ihren Kurzbezeichnungen in Figur 9a

eingezeichnet, nämlich die Domänen CARD, PYD (Pyrin-Domäne), LRR ("Leucin-Rich"-Repeats), NBS (Nukleotid-Bindungsdomäne), WD-Domänen und eine in allen erfindungsgemäßen Proteinen der NALP-Klasse auftretende und hochkonservierte Domäne NAD (NALP-assoziierte Domäne). Die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard weisen darüber hinaus jeweils die charakteristische PYD-Domäne auf, über die die beiden Proteine erfindungsgemäß interagieren können.

Figur 9b stellt dar, daß die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard nicht an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt sind. Hierzu wurden 293T-Zellen mit Plasmidkonstrukten von NOD1, RIP2, NALP1, NALP1-Nter, NALP1-Cter und Pycard sowie mit einem "Mock"-Vektor und mit NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reporter-Plasmiden transfiziert und die relative NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität 24 Stunden nach Transfektion ermittelt. Es ist ohne weiteres erkennbar, daß ausschließlich die beiden Proteine NOD1 und RIP2 an der Induktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt sind, während die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 (bzw. Fragmente von NALP1) und Pycard eine Transkriptions-Aktivität auf dem Niveau des Mock-Vektors aufweisen, also NF- $\kappa$ B nicht aktivieren.

Figur 9c stellt in der linken Auftragung Blots von überexprimiertem NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, die die NAD und CARD-Domäne enthalten) dar, wodurch eine Caspase-5 Prozessierung induziert wird. Hierzu wurden 293T-Zellen mit 0,5  $\mu$ g eines Caspase-5-Plasmids und der indizierten Menge an NALP1-Cter-, Pycard- oder FADD-Expressionsplasmiden transfiziert. Im dargestellten Western-Blot wurde Caspase-5 mit anti-Caspase-5-Antikörper bzw. NALP1 mit anti-Flag-Antikörper detektiert. Bei einer Menge von 3  $\mu$ g NALP1-Cter-

Expressionsplasmid war ein Expressionssignal der Procaspase im Zellextrakt bei Verwendung von anti-Caspase-5-Antikörpern kaum noch erkennbar, d.h. Caspase-5 war weitestgehend prozessiert worden. In der mittleren  
5 Auftragung von Figur 9c ist erkennbar, daß NALP1 mit Caspase-5 interagiert. Hierzu wurde Caspase-5 (2 µg) mit 2 µg der induzierten Flag-markierten Expressionskonstrukte koexprimiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die anti-Flag (M2)-Immunopräzipitate  
10 (IP) im Hinblick auf die Anwesenheit von Caspase-5 analysiert, und die Zellextrakte (xt) wurden mit den angegebenen Antikörpern immunogeblottet. Während im Zellextrakt (unterer Abschnitt der mittleren Figur) bei Koexpression mit NALP1-Cter kein Caspase-5-Signal nach  
15 Einsatz von anti-Caspase-5-Antikörpern erkennbar war, geben die übrigen Versuchsansätze Banden für Caspase-5. In allen Versuchsansätzen (bis auf den Mock-Vektor) sind die entsprechenden Flag-markierten Konstrukte durch anti-Flag-Antikörper nachweisbar. Im Immunipräzipitat ist  
20 Caspase-5 bzw. p35 nachweisbar. p35 ist ein Caspase-5 Spaltprodukt, das die CARD-Domäne und die p20 Caspase-Untereinheit enthält. Das \* in Figur 9c (mittlere Darstellung, oben) zeigt die Position der IgG schwere Kette an. In der rechten Auftragung von Figur 9c sind die  
25 Interaktion der verschiedenen CARD-Caspasen mit NALP1-Cter und dem Protein Raidd dargestellt. Die beiden vorgenannten Proteine wurden Flag-markiert und mit polyklonalem anti-Flag-Antikörper immunipräzipitiert. Die Caspasen wurden durch ihre HA (Hämagglutinin)-Markierung  
30 detektiert. Eine Bande war für Caspase-5 bei Zugabe von erfindungsgemäßem NALP1-Cter deutlich erkennbar, schwache Signale auch für Caspase-2 und Caspase-4, d.h. die C-terminale CARD-Domäne von NALP1 interagierte am stärksten mit Caspase-5. Mit Caspase-9 konnte keine Interaktion  
35 beobachtet werden.

Figur 9d enthält in der linken Darstellung die Ergebnisse von Versuchen, die zeigen, daß die Überexpression von erfindungsgemäßen Pycard die Spaltung von Caspase-1 induziert. Hierzu wurde analog zu Figur 9c (dort für 5 erfindungsgemäßes NALP1-Cter) das Zellextrakt untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei erhöhten Pycard-Konzentrationen, wie im mittleren Abschnitt von Figur 9d (linke Auftragung) durch anti-Pycard-Antikörper gezeigt, eine deutliche Reduktion der Caspase-1-Konzentration im 10 Zellextrakt nachweisbar war, verglichen mit den übrigen Banden, beispielsweise bei NALP1-Cter Zugabe oder FADD Zugabe. In der rechten Darstellung von Figur 9d wird gezeigt, daß Pycard gemeinsam mit Caspase-1 koimmunopräzipitiert. Der verwendete Antikörper ist gegen 15 den N-terminalen Abschnitt (CARD) von Caspase-1 gerichtet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die CARD-Domäne von Pycard stark mit der Caspase-1 interagiert und deren Aktivierung anstößt. Erfindungsgemäßes Pycard verbindet also als Adapter NALP1 und Caspase-1. 20

Figur 10 gibt die Ergebnisse von Experimenten wieder, die zeigen, daß die kombinierte Expression von Caspase-1 und Caspase-5 eine optimale Spaltung von pro-IL1 $\beta$  induziert. 25 Hierbei wurden, wie in Figur 10a dargestellt, 293T-Zellen mit gleichen Mengen von aktivierten Caspase-1 und Caspase-5 Expressionskonstrukten gemeinsam mit entweder leeren Vektoren oder Expressionskonstrukten von NALP1-Cter und Pycard kotransfiziert. Die Caspase-induzierte 30 Spaltung von pro-IL $\beta$  nach Aspartat 116 wurde unter Einsatz von Antikörpern, die spezifisch das p17 Spaltprodukt (IL-1 $\beta$ \*) von pro-IL1 $\beta$  binden können, detektiert. Die Zellextrakte wurden dann immunogeblottet, um die Expressionsniveaus der transfizierten Proteine 35 bestimmen zu können. Hierbei zeigt sich im „Western Blot“ von Figur 10a, daß bei einer Kombination von Pycard,

NALP1-Cter, Caspase-1 und Caspase-5 mit Hilfe von anti-IL1 $\beta$ \*-Antikörpern IL-1 $\beta$ \* detektiert werden kann (s. Figur 10a oben). Die beiden Bildausschnitte im unteren Teil von Figur 10a geben die Kontrollexperimente mit Anti-Flag  
5 bzw. Anti-Pycard-Antikörpern wieder. Diese Ergebnisse entsprechen der Verteilung der entsprechenden Zielproteine in den vier Versuchsansätzen. Das Caspase-5-Spaltprodukt p35 ist mit anti-Caspase-5-Antikörper deutlich sichtbar nur in der rechten Spur der Auftragung  
10 in Figur 10a nachweisbar.

Figur 10b entspricht Figur 10a abgesehen davon, daß gleiche Mengen der Aktivatoren NALP1-Cter und Pycard mit pro-IL1 $\beta$  kotransfiziert wurden und daß die Caspasen  
15 jeweils eigenständig exprimiert oder coexprimiert (rechte Spur) wurden. Das Spaltprodukt IL1 $\beta$ \* ist nur im Western Blot in der rechten Spur, also nach Coexpression, mit den entsprechenden Antikörpern nachweisbar.

Figur 11 stellt die parallele Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-5 während der pro-IL1 $\beta$  Prozessierung in THP.1 Zellen, also unter physiologischen Bedingungen, dar. Hierbei wurde zunächst gemäß Figur 11a die Expression von NALP1, Pycard und Caspase-1 in  
20 verschiedenen Zelllinien durch Western-Blot-Analyse untersucht (293T-Zellen, Jurkat-Zellen, EL4-Zellen, A20, Raji-, Ramos-, BJAB-, THP-1-, U937-, K562-, Raw-, HeLa-Zellen). Hierzu wurden die Zellektrakte (30  $\mu$ g) mit polyklonalen Antikörpern gegen NALP1 sowie Pycard und  
25 monoklonalen Antikörpern gegen Caspase-1 versetzt. Die vorgenannten Zelllinien sind alle humanen Ursprungs, abgesehen von den Lymphozyten-Zelllinien A20 und EL4, die von Mäusen stammen. Das \* bezieht sich auf ein Protein, das mit dem anti-Pycard-Antikörper kreuzreagiert und das  
30 wahrscheinlich einer kürzeren, alternative Spleißversion

von Pycard entspricht. In der rechten Auftragung von Figur 11a wurde eine Spezifitätskontrolle der in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden 293T-Zellen mit NALP1 und Pycard oder einem Mock-  
5 Expressionskonstrukt transfiziert, und die Zellysate wurden mit dem entsprechenden Antikörper versetzt. Insgesamt zeigte sich bei den in Figur 11a dargestellten Versuchen, daß THP-1-Zellen eine starke Expression sowohl von NALP1, von Pycard als auch von Caspase-1 besitzen.  
10 Sie eignen sich daher besonders als Untersuchungsobjekt für die Interaktion von NALP1, Pycard und Caspase-1. Die Spezifität der Antikörper ist, wie aus der rechten Auftragung in Figur 11a hervorgeht, ausgezeichnet.

15 In Figur 11b wurde die Expression von IL1 $\beta$  und Caspase-5 vor und nach Stimulierung mit LPS (1  $\mu$ g/ml, 1h, Bedingungen wie im folgenden für Figur 11c beschrieben, dargestellt). Nach Stimulierung mit LPS ist hierbei im Zellextrakt mit den entsprechenden Antikörpern sowohl  
20 Caspase-5 als auch pro-IL1- $\beta$  nachweisbar. THP1-Zellen exprimieren Caspase-5 jedoch auch ohne LPS-Aktivierung.

Figur 11c gibt die Ergebnisse von Versuchen wieder, die sich ergeben, wenn Zellysate von mit LPS prästimulierten  
25 THP.1-Zellen bei 30°C für die in Figur 11c oben dargestellten Zeiträume inkubiert wurden. Caspase-1-Aktivierung ist nämlich spontan zu beobachten, wenn cytoplasmatische Zellextrakte auf 30°C erwärmt werden. Es wurde die Aktivierung von Caspase-1, Caspase-5, Caspase-9  
30 und pro-IL1 $\beta$ , gefolgt vom Western Blotting in Gegenwart oder Abwesenheit von Caspase-Inhibitoren zVADfmk (50  $\mu$ M), YVADfmk (5  $\mu$ M) und Proteasom-Inhibitor LLnL (50  $\mu$ M) zeitabhängig ermittelt. Cytochrom C (1 ng) wurde zur Aktivierung von Apaf-1 und Caspase-9 hinzugegeben. Die  
35 monoklonalen Antikörper, die eingesetzt wurden, um

Caspase-5 und Caspase-9 zu detektieren, erkennen jeweils die p20-Untereinheit. In den vier Bildabschnitten der Figur 11c sind die jeweiligen Banden, die durch Markierung mit anti-Caspase-1-Antikörper, anti-Caspase-5-Antikörper, anti-Caspase-9-Antikörper und anti-IL1 $\beta$ -Antikörper erhalten werden, dargestellt. Hierbei ergab sich, dass Caspase-9 nur prozessiert wurde, wenn Cytochrom C dem Zellextrakt hinzugegeben wurde. Die Caspase-1 und Caspase-5 hingegen zeigen ähnliche Kinetiken, weswegen beide auf einem Caspase-9-unabhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert werden. Die Caspasen-1 und -5 werden jeweils zeitabhängig nach Aktivierung in ihre Spaltprodukte zerlegt (p20, p35, Nter). Gleichzeitig mit der Aktivierung der Caspasen-1 und -5 (Auftreten der Spaltprodukte) kann das p17-Fragment (aktives Spaltprodukt von proIL-1 $\beta$ ) detektiert werden. Bei Zugabe der beiden Caspase-1-Inhibitoren zVADfmk und YVADfmk wurde die proIL-1 $\beta$ -Aktivierung blockiert.

Schließlich sind in Figur 11d die Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1 $\beta$ -Aktivierung nach Stimulierung von THP1-Zellen durch LPS (10  $\mu$ g/ml) (anstelle der Erhöhung der Inkubationstemperatur, wie in Fig. 11c) wiedergegeben. Die THP1-Zellen wurden mit PMA vor der LPS-Zugabe prästimuliert. Die Aktivierung von pro-IL1 $\beta$ , Caspase-1 und Caspase-5 wurde sowohl in den Zellextrakten (xt) als auch in den Überständen (SN) gemessen. Die oberen drei Bildausschnitte stellen dabei die Messung in den Überständen (SN) dar, die unteren vier Bildausschnitte Messungen der Anwesenheit in Zellextrakten. Die einzelnen Spuren entsprechen unterschiedlichen Stimulationszeiträumen (mit oder ohne Zugabe von Caspase-Inhibitor zVAD). Die jeweils zur Detektion eingesetzten Antikörper sind links von den Bildausschnitten

verzeichnet, die entsprechenden Bandenpositionen sind rechts durch entsprechende Pfeile namentlich indiziert. PARP (unterster Bildausschnitt) ist ein Spaltprodukt, das der Caspase-3-Aktivierung erkennen läßt. Die Spaltung von  
5 pro-IL1 $\beta$  wurde durch einen Antikörper, der spezifisch die gespaltene Form von pro-IL1 $\beta$ , also IL1 $\beta$ \*, erkennt, detektiert (anti-IL1 $\beta$ \*). Während in den Zellextrakten keine aktiven Formen von Caspase-1 oder Caspase-5 auftreten, sind diese ebenso wie die aktive Form p17  
10 (aktives Spaltprodukt von proIL-1 $\beta$ ) in den Überständen nachweisbar. D.h. aktive Formen von Caspase-1 und Caspase-5 werden aus den Zellen gemeinsam mit p17 in den Überstand sezerniert. Eine Spaltung (Aktivierung) von PARP als proapoptotisches Signal (unterster  
15 Bildausschnitt) findet dagegen erwartungsgemäß nicht statt.

Um zu überprüfen, ob NALP1, Caspase-1, Caspase-5 und Pycard tatsächlich zur Aktivierung von proIL-1 $\beta$   
20 zusammenwirken, wurden nicht-aktivierte Zellextrakte von THP1-Zellen mit Gelfiltrationsmethoden untersucht. Figur 12 stellt Ergebnisse dar, die zeigen, dass die Bildung eines Komplexes stattfindet, der NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 enthält, das sogenannte Inflammosom.  
25 Hierbei beruhen die in Figur 12a dargestellten Ergebnisse auf folgenden Versuchsansätzen: THP1-Zellysate wurden für die Dauer von 60 min bei 30°C inkubiert; diese Bedingungen führten zu spontaner Aktivierung von pro-IL1 $\beta$  (s. Figur 11b). Hierzu wurden Zellextrakte  
30 größenfraktioniert auf Superdex S-200 Säulen. Das Elutionsmuster von NALP1, Pycard und Capase-1 in den Zellextrakten vor und nach der Aktivierung, d.h. nicht stimuliert und stimuliert, ist dargestellt. Die weißen Pfeile geben die Elutionspositionen der Proteine, die zu  
35 einem Komplex von höherem Molekulargewicht hin verschoben

sind an (Inflammosom-Fraktionen 19 und 20). In der Kopfzeile von Figur 12a ist der Standard wiedergegeben (in kDa), also die Positionierung entsprechend großer Proteine in den einzelnen Fraktionen. Die verschiedenen Bildausschnitte geben die Elutionsprofile für NALP1, Pycard, Caspase-1 und FADD (letzteres zu Vergleichszwecken) wieder. Figur 12a zeigt, dass NALP1 (mit einem theoretischen Molekulargewicht von 156kDa) bereits ohne Stimulierung als Multiproteinkomplex vorliegt (ca. 700 kDa). Nach Auslösung der Caspase-1-Aktivierung kann eine deutliche Verschiebung des NALP1-Komplexes zu einem höheren Molekulargewicht (ca. 700 kDa) beobachtet werden. Auch Pycard und Caspase-1, die im nicht-stimulierten Zustand erwartungsgemäß bei ca. 30 kDa bzw. 60 kDa eluieren, werden nach Stimulation zumindest tw. auch in der 700 kDa-Fraktion, enthaltend NALP1, beobachtet. NALP1, Pycard und die beiden Caspasen Caspase-1 und Caspase-5 bilden das Inflammosom.

Figur 12b zeigt, daß NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 einen Komplex bilden, und zwar zeitabhängig. Hierbei wurden Extrakte von THP1-Zellen für verschiedene Zeiträume, wie in der Kopfzeile von Figur 12b wiedergegeben, stimuliert, indem bei 30°C inkubiert wurde. Die Immunopräzipitation erfolgte durch anti-Pycard-Antikörper (linke Auftragung) oder anti-NALP1-Antikörper (rechte Auftragung). Es wurde dann mit Hilfe der in Figur 12b jeweils dargestellten Antikörper im Western Blot die Anwesenheit von Caspase-1, Caspase-5 bzw. NALP1 untersucht. Wiederum sind rechts von den dargestellten Bildausschnitten die Positionen der dort zu erwartenden Proteine oder Proteinfragmente dargestellt (s.o.). Im Ergebnis coimmunopräzipitiert Caspase-1 entweder mit Pycard oder mit NALP1 in THP1-Zellextrakten in aktivierungsabhängiger Weise. Im Unterschied zum Zellextrakt lag im Immunopräzipitat im wesentlichen die

prozessierte (aktivierte) Form von Caspase-1 vor. Die Caspase-1-Bindung ist transient, da 2h nach der Stimulierung deutlich weniger Caspase-1 im Inflammosom nachweisbar war. Neben Caspase-1 immunopräzipitieren  
5 anti-Pycard-Antikörper auch die Caspase-5 und NALP1 abhängig von der Stimulation.

Figur 13 gibt Ergebnisse wieder, die zeigen, daß Pycard (und NALP1) für die Caspase-1- und Caspase-5-Aktivierung  
10 in THP1-Zellen unerlässlich ist. Hierzu wurden gemäß Figur 13a THP1-Zellysate bei 30°C für verschiedene Zeiträume und in Anwesenheit oder Abwesenheit von gegen beispielsweise Pycard oder NALP1 gerichteten Antikörpern und weiteren Kontroll-Antikörpern (MLTparacaspase,  
15 TRAMP/DR3, RIP2) stimuliert. Die Aktivierung von Caspase-1 wurde dann, wie in Figur 11b, beschrieben weiterverfolgt. In den beiden Bildabschnitten der Figur 13a ist oben ein Western Blot mit anti-Caspase-1-Antikörpern und unten ein Western Blot mit anti-Caspase-  
20 5-Antikörpern zu sehen. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Zugabe von anti-Pycard-Antikörpern zu Zellextrakten die Caspase-1-Aktivierung sofort herunterreguliert, die anderen zur Kontrolle eingesetzten Antikörper hingegen keinen Effekt bewirken. Anti-Pycard- oder anti-NALP1-  
25 Antikörper bewirkten eine Inhibierung der Caspase-5-Aktivierung.

Figur 13b gibt die Dosisabhängigkeit der durch anti-Pycard-Antikörper erzielten Inhibition der Caspase-5  
30 Aktivierung wieder. Diese Antikörper in entsprechenden Konzentrationen führen dazu, daß das p20-Spaltprodukt von Caspase-5 nicht mehr im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektierbar ist. Der inhibitorische Effekt von anti-Pycard-Antikörpern war also dosisabhängig.

Die Ergebnisse in Figur 13c bestätigen, daß anti-Pycard-Antikörper nicht mit der Cytochrom c-vermittelten Caspase-9-Aktivierung interferiert (die experimentellen Bedingungen sind im Zusammenhang mit Figur 11 beschrieben). Das Caspase-9-Spaltprodukt p20 ist mit anti-Caspase-9-Antikörpern nämlich weiterhin detektierbar, es findet also keine Inhibition statt.

Figur 13d stellt die Ergebnisse von Versuchen dar, bei denen THP1-Zelle extrakte mit Protein G-adsorbierten, gegen Pycard oder NALP1 oder als Kontrolle Ig gerichteten Antikörpern inkubiert wurden. Nach der Entfernung der entsprechenden Kügelchen wurde der Immunniederschlag von Pycard und NALP1 durch Western-Blot-Analyse untersucht. Die Caspase-1-Aktivierung wurde dann durch eine Temperaturerhöhung von 0° auf 30°C hervorgerufen. Hierbei wird Caspase-9 nur aktiviert (also p20 vorhanden), wenn Cytochrom C den Proben hinzugegeben wird. Wenn Pycard durch Zugabe von entsprechenden Antikörpern aus dem Zellextrakt durch Fällung vor der Stimulierung entfernt wird, wurde die Caspase-1-Aktivierung vollständig blockiert. Trotz unvollständiger Fällung von NALP1 mit Hilfe entsprechender Antikörper wurde dennoch eine signifikante Reduktion der Caspase-1-Aktivierung beobachtet.

Figur 14 gibt die Inhibierung der pro-IL1 $\beta$  Prozessierung durch dominant negative Varianten von Pycard (DN) wieder. Gemäß Figur 14a wurden THP1-Zellen durch Verwendung eines retroviralen Vektors, der die Flag-markierte Pyrin-Domäne (Aminosäuren 1 bis 94, ohne CARD-Domäne) von Pycard und ein Resistenz-Gen gegen Puromycin kodiert, infiziert. Dieses Konstrukt ohne CARD-Domäne bindet an NALP1, aber nicht an Caspase-1, ist also eine erfindungsgemäße Verbindung zur Blockade der NALP1/Pycard-induzierten Caspase-1-Aktivierung. Nach Selektion mit Puromycin

wurden stabil transfizierte Zellpopulationen im Hinblick auf ihre Expression von Flag-markierten Proteinen durch Western-Blot-Analyse untersucht (gemäß Figur 14a sind zwei verschiedene Populationen dargestellt). Gemäß Figur 5 14a erhaltene stabil transfizierte Zellen, die DN-Pycard exprimieren, wurden mit LPS (10 µg/ml) für die angegebenen Zeitabschnitte behandelt, und die Prozessierung von Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1ß in den entsprechenden Zellüberständen (SN), wie in Figur 11d 10 beschrieben, bestimmt. In den linken Spuren wurde DN-Pycard hinzugegeben, in den rechten Spuren ein Mock-Vektor als Kontrolle.

In dem oberen Bildausschnitt von Figur 14b ist deutlich 15 erkennbar, daß prozessiertes IL1ß\* in den angegebenen Stimulationszeiträumen nur dann auftritt, wenn entsprechende Mock-Konstrukte eingesetzt wurden, dagegen konnten nur ganz schwache Signale bei Anwesenheit von DN-Pycard beobachtet werden. Auch im Hinblick auf Caspase-1 20 und Caspase-5 sind die prozessierten Formen im Falle einer Zugabe von DN-Pycard nur in geringen Mengen nachweisbar, es findet also keine Aktivierung (Sekretion) der Caspasen-1 und -5 statt. Dagegen hatte die expression von DN-Pycard keine Wirkung auf die LPS-induzierte NF-kB- 25 Aktivierung oder die pro-IL1ß-Synthese.

Die beigefügten Anlagenblätter A1 bis A9 ist Bestandteil der vorliegenden Offenbarung.

30

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher charakterisiert:

35 Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Um zu überprüfen, ob die PYD-Domänen - wie auch die Domänen DD, DED, CARD - die Eigenschaft haben, nur mit Mitgliedern innerhalb der eigenen Familie von "6-Helix-Bündel-Proteinen" zu interagieren, wurden Expressionsvektoren für PYD-Proteine hergestellt und mit Coimmunopräzipitations-Experimenten ihre Eignung zur Interaktion mit anderen Proteinen überprüft. Hierzu wurden Pycard-Konstrukte durch PCR-Techniken aus den folgenden IMAGE-EST-Klonen amplifiziert: AA528254(965955) und AI148558(1714818). Pycard wurde mit den folgenden Primern amplifiziert: JT1509 5'-ATGGGGCGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde mit JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3' amplifiziert.

NALP1-Konstrukte wurden mit PCR-Methoden amplifiziert, indem die KIAA0926-EST-Klone aus dem Kazusa-DNA-Research Institut als "Template" verwendet wurden. NALP1-PYD wurde mit JT1497 5'-ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-GATCCAGGGCATTAGCAC-3' amplifiziert. NALP1-CARD wurde mit JT1500 5'-GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-GATGAGACTCTGGTGTGG-3' amplifiziert.

Die amplifizierten Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (von Invitrogen) ligiert und in der EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag, die die PCR-3 (von Invitrogen) abgeleiteten Vektoren enthalten, subkloniert, wie bei Thome et al. (1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben. Die anderen eingesetzten Konstrukte wurden bereits vorher bei Thome et al. (1999 J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben und sind in Hinblick auf die Darstellung der experimentellen Ausführung Bestandteil der vorliegenden Offenbarung. Die Veröffentlichung von Burns et al. (1998, J. Biol. Chem., 273, 12203-12209) beschreibt die Durchführung der Immunopräzipitation. Sie ist gleichfalls Bestandteil der vorliegenden Offenbarung und läßt sich zusammengefaßt so darstellen:

293T-Zellen, die in DMEM-Medium kultiviert wurden, das mit 10%igen fötalem Kälberserum Glutamin ergänzt wurde, wurden mit einer Dichte von  $1-3 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-  
5 Platte angesetzt und mit 3µg des jeweiligen Konstrukts am nächsten Tag durch die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Die Zellen wurden gesammelt und in Lyse-Puffer 24 bis 26 Stunden nach der Transfektion lysiert (der Lysepuffer enthält 0,2% NP40,  
10 150mM NaCl, 50mM EDTA, 30mM Tris, pH 7,4). Die Zell-Lysate wurden für mindestens drei Stunden auf Sepharose 6B (von Pharmacia) vor der Präzipitierung mit einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für 4 Stunden mit 3µl einer Flag-Agarose (von Kodak International  
15 Biotechnology) von 3µl von Sepharose 6B Kügelchen vorgereinigt. Das Harz wurde sechsmal in Lysepuffer gewaschen und nach der letzten Wäsche wurde gebundenes Protein durch Kochen im Probenpuffer eluiert, separiert durch SDS-PAGE und auf Nitrocellulose transferiert (von  
20 Hybond ECL, Pharmacia), um nachfolgend das Western-Blotting durchführen zu können. Die anti-VSV und anti-Flag-Antikörper stammen von Sigma. Ein HRP-konjugierter Antikörper wurde eingesetzt, der spezifisch die schweren Ketten von murinem IgG1 (von Southern Biotechnology  
25 Associates) detektierte.

Wie in Fig. 4 als Ergebnis des vorliegenden Ausführungsbeispiels gezeigt, konnte eine spezifische Bindung von Pycard mit dem PYD-Domän von Pycard und NALP  
30 dann detektiert werden, wenn eine Coexpression mit VSV-markiertem Pycard, Flag-markierten Konstrukten, die entweder die PYD-Domäne von Pycard oder die PYD-Domäne von NALP1 enthalten coexprimiert wurden. Dagegen wurden keine Interaktion der PYD-Domäne von Pycard mit anderen  
35 PYD-Domänen oder mit Todesdomänen, CARD-Domänen oder Todeseffektordomänen (letzteres ist in Fig. 4 nicht dargestellt)

festgestellt. Daher interagiert eine PYD-Domäne spezifisch mit PYD-Domänen über eine Protein-Protein-Wechselwirkung. Im Ergebnis zeigt Fig. 4 also, daß Pycard mit Hilfe seiner PYD-Domäne homodimerisiert und mit der  
5 PYD-Domäne von NALP1 interagiert.

## 2. Ausführungsbeispiel

10 NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, der NAD- und der CARD-Domäne entsprechend), wurde mit Hilfe von JT1658 (5'-aaactcctggacgtgagcaag-3') und JT1500 (5'-tcagctgagtggcaggag-3') amplifiziert und in dem Säugerexpressionsvektor pCR3 im entsprechenden Leseraster  
15 mit der "tag"-Markierung subkloniert. In ähnlicher Weise wurde NALP1 Nter (AS 1 bis 665, entsprechend der Pyrin- und der NBS-Domäne) mit Hilfe der Primer JT1497 (5'-atggctggcggagcctggggc-3') und JT1526 (5'-caggcctagtagtccata-3') amplifiziert. Die  
20 Expressionskonstrukte für Caspase-4, Caspase-1, und Caspase-9, Flag-markiertem RIP2, Apaf1, RAIDD, Bcl10, IL-1 $\beta$ , wurden entsprechend der Beschreibung bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998) und Thome et al. (J. Biol. Chem. 274, 9962 bis 9968 (1999)) zur Verfügung gestellt.  
25 Die Plasmide, die für Caspase-5 und NOD1 kodieren, stammen von Christoph Fröhlich bzw. Gabriel Nunez (Department of Pathology, Univ. of Michigan Med School, 1500 E. Medical Center, Ann Arbor, MI 48109, USA).  
Transiente Transfektion von 293T-Zellen, die Zellyse, die  
30 Immunopräzipitationsanalyse, das "Immunoblotting" und der NF- $\kappa$ B-Assay wurden so durchgeführt wie bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998)) beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird und was in die Offenbarung referenziell eingeschlossen ist. Die  
35 vorgenannten Verfahren wurden wie an vorzitiertem Stelle beschrieben, durchgeführt, abgesehen von der Verwendung

von Ig schwerkettenspezifischen Antikörpern (HRP-konjugierten Ziegen-anti-Maus IgG1 und Ziegen-anti-Kaninchen IgG als Sekundärreagenz im Rahmen des "Western-Blottings" (Southern Biotechnology, Birmingham, GB).

5

Polyklonale Antikörper wurden durch Injektion von MAP-Peptiden, die den Aminosäuren 2 bis 25 von NALP1, den Aminosäuren 2 bis 27 von Pycard entsprechen in Kaninchen (Eurogentec, Belgien) und nachfolgender Immunreinigung auf den entsprechenden Peptiden hergestellt. Der monoklonale Antikörper, gerichtet gegen die CARD-Domäne von Caspase-1, stammt von Junying Yuan (Boston, MA 02115, USA, Harvard Medical School, 240 Longwood Av.)

10

Die weiteren Antikörper wurden von den folgenden Herstellern erworben: Caspase-5 (MBL), Caspase-9, PARP, gespaltenes IL-1 $\beta$  D116 (Cell Signaling), Anti-Flag-Antikörper (M2, Sigma), Anti-VSV-Antikörper (P5D4, Sigma), Caspase-3 (Transduction Laboratories).

20

Zur in-vitro Caspase-1/pro-IL1 $\beta$ -Aktivierung wurden THP.1 Zellen in Suspension in entsprechenden Flaschen in RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum, 50 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol und Penicillin/Streptomycin (jeweils 100  $\mu$ g/ml) bis zu einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgezogen und für eine Stunde mit LPS (1  $\mu$ g/ml) prästimuliert. Zytosolische Extrakte wurden, wie bei Liu et al. (Cell 86, 147 - 157, 1996) beschrieben, hergestellt. Zusammenfassend läßt sich hierzu sagen, daß die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen wurden, in 5 Volumina eisgekühltem hypotonischen Puffer W (20 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na EDTA, 1 mM Na EGTA, und 0,1 mM PMSF) unter Hinzufügung eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Roche, Basel, CH) aufquellen

30

35

konnten. Nach einer 15 min. Eiskühlung wurden die Zellen durch 15-malige Passage durch eine G22-Nadel aufgebrochen. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände filtriert (0,45µ) und für den in-vitro IL-1β Spaltungsassay verwendet.

Die Immunopräzipitation von endogenem Caspase-1/NALP1, Pycard-Interaktionskomplex wurde unter Zuhilfenahme von  $5 \times 10^8$  THP.1 Zellen pro Zeitpunkt durchgeführt. Die in-vitro Inflammosom-Aktivierung wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Mit 3 µg des indizierten Antikörpers bei 4°C im Puffer W, mit 20 µl Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) für 4 Stunden, wurde immunopräzipitiert. Die Komplexe wurden durch Zentrifugation wiedergewonnen und 6mal mit dem Puffer W gewaschen. Um Pyrin und NALP1 immunologisch niederzuschlagen, wurden THP.1-Zellextrakte mit auf Protein-G-Kügelchen adsorbierten Antikörpern für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Entfernung der Kügelchen wurde die Caspase-1-Aktivierung durch Temperaturerhöhung auf 30°C angestoßen.

Die aktivierten Proben (inkubiert bei 30°C) oder die nicht-aktivierten Proben (bei 4°C belassen, Kontrollproben) wurden auf Superdex-200 HR 10/30 Säulen geladen und die Proteine wurden im Puffer W bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, als 0,5 ml Fraktionen, eluiert. Das "Western-Blotting" wurde nach Chloroform:Methanol-Präzipitierung der Gesamtfraktion durchgeführt. Die Säule wurde mit den folgenden Proteinen als Standard kalibriert: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserum-Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa).

Um eine LPS-Aktivierung der Caspase-1/Pro-IL-1 $\beta$ -Aktivierung zu erreichen, wurden THP.1-Zellen mit 0,5  $\mu$ M PMA (Calbiochem) für die Dauer von 3 Stunden differenziert. Die Zellen wurden gewaschen und auf 24 "Well"-Platten bei einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro "Well" ausplattiert und dort belassen, um über Nacht sich anheften zu können. Nach dem Waschen im Medium ohne FCS, wurden die Zellen mit LPS 10 $\mu$ g/ml (E.coli 055:B5, Sigma), wie in Fig. 11 gezeigt, behandelt oder nicht behandelt. Die Zellüberstände und Zelniederschläge wurden entnommen und durch "Western-Blotting" hinsichtlich verschiedener Caspasen und IL-1 $\beta$  analysiert.

Um stabile Zelllinien herzustellen, wurden Flag-markierte dominant negative (DN) Formen von Pycard (AS 1 bis 94, entsprechend der Pyrin-Domäne) in MSCV Puromycin-selektierbare retrovirale Vektoren (Clontech) kloniert und ein rekombinantes Virus wurde erhalten und nach Transfektion von 293T-Zellen in Kombination mit einem Vektor, enthaltend die viralen Strukturgene (VSV-G "Pseudotyping" Vektor), titriert. THP.1-Zellen wurden infiziert, mit Puromycin (5  $\mu$ g/ml) für die Dauer von 2 Wochen selektiert und die Zellpopulationen wurden auf die Proteinexpression, Caspase-1, Caspase-8 und IL-1 $\beta$ -Aktivierung hin analysiert.

## Anlagen A1 bis A9

5

A1:

In pro-apoptotischen Signaltransduktionskaskaden wird die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Initiatoreinheiten, wie z.B. dem Todesrezeptor Fas, den  
10 verschiedenen Adaptorproteinen und den Caspasen in erster Linie durch drei strukturell verwandte Protein-Protein-Domänen, nämlich der Todesdomäne (DD), Todeseffektordomäne (DED) und der Caspaserekrutierungsdomäne (CARD), vermittelt. Im vorliegenden Fall wird der Nachweis erbracht, dass eine vierte verwandte Domäne, die Pyrindomäne (PYD) genannt, existiert. Die PYD wird in Pyrin, einem Protein, das  
15 bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist, bei Pycard, einem Regulator der Etoposid-vermittelten Apoptose, bei einer Caspase vom Zebrafisch und in zwei neuen Proteinen (NALP1, NALP2), die strukturell mit dem Apoptose-Regulationsprotein Card4/Nod1 verwandt sind, beobachtet. Für die PYD-Domäne von Pycard wurde nachgewiesen, dass sie homodimerisiert und mit PYD von NALP1  
20 interagiert. Die Identifizierung der PYD-Familienmitglieder kann hierbei zur kurzfristigen Charakterisierung von pro-apoptotischen und/oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen beitragen.

## Einführung

25 Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein wesentlicher Vorgang bei Tieren und Pflanzen, insbesondere für die Beseitigung von unerwünschten Zellen in einer geordneten Art und Weise. Während der letzten Jahre ist ein erheblicher Fortschritt bei der Identifizierung und Charakterisierung der modularen Natur von Molekülen, die für die Regulation und Exekution der Apoptose verantwortlich sind, erzielt worden  
30 (Aravind et al., 1999, Hofmann, 1999). Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass drei Familien von Homologiedomänen, die Todesdomäne (DD), die Todeseffektordomäne (DED) und die Caspaserekrutierungsdomäne (CARD) existieren, die entfernt miteinander verwandt sind, und eine Superfamilie von „Sechs-Helix-bundle“-Proteininteraktionsdomänen bilden. Bei diesen Domänen ist insbesondere wichtig, dass  
35 sie hochspezifische Wechselwirkung mit Mitgliedern der gleichen Subfamilie ausüben und in den meisten Fällen auch eine Rolle beim Signaltransduktionsprozess, der zur

Apoptose und/oder Entzündung führt, spielen. Im Besonderen ist zu beachten, dass die „Adaptorebene“ von Proteinen, die nämlich die Todesrezeptorsignale zu den Caspasen transportieren, stark mit Proteinen besetzt ist, die Kombinationen von Domänen von DD/DED/CARD aufweisen. Aufgrund der großen Bedeutung und der Vorhersagbarkeit ihrer Funktion sind mehrere systematische Suchen nach neuen Proteinen, die diese Domänen enthalten, erfolgreich durchgeführt worden. Hierdurch wurde die Entdeckung von Proteinen wie FLIP, CARDIAK/RIP2, ARC, Bcl10, DEDD (Irmeler et al., 1997; Koseki et al., 1998; McCarthy et al., 1998; Stegh et al., 1998, Thome et al., 1999) möglich. Im folgenden berichten wir von der Entdeckung einer neuen Domänenart, die im folgenden PYD (Pyrindomäne) genannt wird. Diese kann als vierte Subfamilie innerhalb der „Sechs-Helix-„bundle“-Interaktionsdomänen“ bezeichnet werden, nämlich aufgrund von Sequenzhomologien, Strukturvorhersage und Interaktionseigenschaften.

15

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Identifizierung einer neuen Domäne: Die Pyrin-Domäne

Im Zuge der Analyse der Sequenz des kürzlich identifizierten Proteins Pycard mit einer CARD-Domäne (PYD und CARD enthaltendes Protein), das auch als ASC („Apoptose-assoziiertes Speckle-ähnliches Protein“) bekannt ist, wurde realisiert, dass die zweite strukturelle Domäne, die am N-Terminus von Pycard (Pyrindomäne, PYD) auftritt, eine schwache, aber signifikante Sequenzhomologie zu einer Vielzahl anderer Proteine (Figur 1A) aufweist. Pycard ist ein 22-kDa-Protein, das Aggregate bildet, sobald die Apoptose durch gewisse Antitumorsubstanzen induziert wird (Masumoto et al., 1999).

Darüber hinaus ist festzustellen, dass bei Zellen, die dazu gezwungen wurden, reduzierte Mengen von Pycard zu exprimieren, die Etoposid-vermittelte Apoptose gleichfalls signifikant unterdrückt ist. Unter Verwendung von PYD von Pycard ergab eine einfache BLAST-Suche, dass zwei zusätzliche PYD-enthaltende Proteine in der Sequenzdatenbank enthalten sind, nämlich Pyrin und Caspy. Pyrin wurde anfänglich als Produkt des MEFV (Mittelmeerfieber)-Gens identifiziert, das bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist (FrenchFMFConsortium, 1997;

InternationalFMFConsortium, 1997), ein erbliches periodisches Fiebersyndrom, das durch episodisches Fieber und serosale und synoviale Entzündung charakterisiert ist. Der Erkenntnisstand im Hinblick auf Pyrin basiert im wesentlichen auf seiner Domänenstruktur, die, zusätzlich zur PYD-Domäne, auch einen B-Box-Zinkfinger und eine „Spry“-Domäne aufweist (Figur 1B). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Pyrin ein Mitglied der RoRet-Genfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren ist, was Anlaß zur Spekulation gab, dass das Protein als ein transkriptionaler Inflamationsregulator (Centola et al., 1998) fungiert. Neuere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass Pyrin in Zytoplasma lokalisiert ist und keine nachweisbare transkriptionale Aktivität aufweist (Chen et al., 2000; Tidow et al., 2000). Daher ist die genaue Funktion von Pyrin bei inflammatorischen Krankheiten immer noch ungeklärt.

Auf der Basis der PYD-Sequenz dieser beiden Proteine wurde ein allgemeines PYD-Profil erstellt (Bucher et al., 1996) und in den nachfolgenden Suchschritten in der EST-Datenbank eingesetzt. Zwei zusätzliche PYD-enhaltende Proteine NALP1 und NALP2 (NACHT; LRR und PYD-enhaltende Proteine) wurden identifiziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass die NALPs eine PYD-, NACHT- und LRR-modulare Organisation aufweisen (Figur 1A, B). Die NACHT- und LRR-Domänenarchitektur wird bei Proteinen aufgefunden, die an der Inflammation oder Apoptose beteiligt sind, insbesondere bei CARD4/Nod1 (Figur 1B), ein NF- $\kappa$ B-induzierendes Molekül (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999), einem neuronalen Apoptose-Inhibitor-Protein, NAIP, und dem MHC Klasse II-Transkriptionsaktivator, CIITA (Koonin und Aravind, 2000). Interessanterweise ist die Domäne PYD von NALP2 durch CARD bei CARD4/Nod1 ausgetauscht, während die strukturelle Gesamtorganisation konserviert ist, was eine ähnliche Funktionalität vermuten lässt (Figur 1B). CASPY ist ein PYD- und Caspasedomäne enthaltendes Protein, das anfänglich mit einer Datenbanksuche nach Zebrafisch-Homologen von Apoptoseregulatoren von Säugern (Inohara und Nunez, 2000) identifiziert wurde. Diese Caspase ist am stärksten homolog zur Caspase-13, die beim Menschen CARD anstelle von PYD enthält. Beachtenswert ist, dass die gleiche Untersuchung ein Pycard-verwandtes Protein bei Zebrafischen identifiziert hat, was eine hohe evolutionäre Konservierung dieser Proteine indiziert (Figur 1A).

### Die Pyrin-Domäne ist verwandt mit der DD-Familie

Auf der Basis von Sequenzvergleichen wurde vorgeschlagen, dass die Domänen DD, DED und CARD strukturell verwandte Protein-Proteininteraktionsmodule darstellen (Hofmann et al., 1997). Alle drei Domänenarten haben eine ähnliche Größe und die Sekundärstruktur-analyse ergab eine ähnliche Anordnung der sechs  $\alpha$ -Helices. Alle drei Domänen teilen also die Eigenschaft, Homo- oder Heterodimere bilden zu können, und sind außerdem hochkonserviert (Hofmann et al., 1997). Die Strukturvorhersage wurde später durch NMR-Analyse der DDs, DEDs und CARDS (Chou et al., 1998; Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou et al., 1999) bestätigt, da die strukturelle Topologie dieser Domänen sich als sehr ähnlich erwies, insbesondere im Hinblick auf den strukturellen Kern, der durch die Helices  $\alpha 2$  bis  $\alpha 5$  gebildet wird (Figur 2). Einschließlich der PYD-enthaltenden Sequenzen in einem allgemeinen „Alignment“ gegenüber DED, CARD und DD, wurde erfindungsgemäß die PYD-Domäne als ein potentiell viertes Glied der „DD-gefalteten“ Superfamilie identifiziert (Figur 2).

Trotz der Ähnlichkeit ihrer Faltung ist bekannt, dass DD, DED und CARD ausschließlich, mit Mitgliedern der eigenen Subfamilie interagieren, so dass keine Promiskuität zwischen den Domänen festgestellt werden konnte. Um zu überprüfen, ob die PYDs die gleichen Eigenschaften aufweisen, wurden Expressionsvektoren für die PYD-Proteine erzeugt, und in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten auf ihre Eigenschaft, mit anderen Proteinen zu interagieren, getestet. Wie in Figur 3 dargestellt, wurde eine spezifische Bindung von Pycard mit den PYDs von Pycard und NALP1 detektiert, wenn eine Koexpression mit einem VSV-markierten Pycard, Flag-markierten Konstrukten enthaltend die PYD von Pycard oder die PYD von NALP1 ausgeführt wurde. Keine Interaktionen der PYD von Pycard mit anderen PYDs oder mit DDs, CARDS oder DEDs (Figur 3) wurden nachgewiesen. Daher ist die PYD-Domäne eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die spezifisch mit PYD-Domänen interagiert.

30

Pycard mit seiner PYD-CARD zweigeteilten Domänenorganisation erinnert an das DD und DED enthaltende Molekül FADD oder das DD und CARD enthaltende Protein RAIDD. Für beide Proteine ist bekannt, dass sie ein DD enthaltendes Protein mit einem

- eine DED- oder CARD-Domäne enthaltenden Protein adaptieren. Beispielsweise erfordert die DD von Fas FADD, um an die DED von Caspase-8 zu binden. Unsere Resultate lassen vermuten, dass Pycard ein neues Adaptormolekül darstellt, das NALP1 an ein noch unbekanntes und zu definierendes CARD-enthaltendes Protein koppelt. Tatsächlich zeigen erste Resultate, dass die CARD von Caspase-5 die Zielstruktur von Pycard-CARD ist. Die physiologische Rolle dieser Interaktion wird zur Zeit noch untersucht.
- 10 Zusammenfassend ist festzustellen, dass wir PYD als ein neues Protein-Protein-Interaktionsmodul identifiziert haben, das alle Kriterien eines Mitglieds der DD-Faltungsfamilie erfüllt. Vergleichbar zur beschränkten Interaktions-Fähigkeit, die für andere Mitglieder gilt, interagieren PYDs nur mit PYDs und nicht mit Mitgliedern der drei anderen Subfamilien. Darüber hinaus werden PYDs im Zusammenhang mit
- 15 Proteinen, die an der Apoptose und der Inflammation beteiligt sind, gefunden, was am besten durch die Caspase Caspy belegt ist. Regelmäßig treten PYDs zusammen mit CARDS, wie z.B. bei NALP1 und Pycard, auf. Die Identifizierung der neuen, PYD-enthaltenden Proteine ermöglicht daher wahrscheinlich die Charakterisierung von neuen pro-apoptotischen oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen, wie es auch
- 20 der Fall war nach der Identifizierung der DD von Fas vor einigen Jahren (Itoh und Nagata, 1993). Wir glauben, dass die Charakterisierung von NALP1 und dem Pycard-Komplex bereits der erste Schritt in diese Richtung ist, was schließlich zu einem besseren Verständnis der molekularen Ursachen von inflammatorischen Krankheiten führen wird.

25

## METHODEN

### Sequenz- und Strukturanalyse

- 30 Die Blast- und Profile-Algorithmen wurden verwendet (Bucher et al., 1996), die auf dem ISREC-Server ([www.isrec.isb-sib.ch](http://www.isrec.isb-sib.ch)) verfügbar sind. Die Sekundärstruktur wurde nach den Algorithmen von Rost und Sander (1993) vorhergesagt.

### Klonierung, Expression und Immunopräzipitation

Pycard-Konstrukte wurden durch PCR aus den folgenden IMAGE EST-Klonen  
5 amplifiziert:

AA528254 (965955) und A1148558 (1714818). Pycard wurde amplifiziert mit den  
folgenden Primern: JT1509 5'-ATGGGGCGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-  
TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde amplifiziert mit  
10 JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3'.

NALP1-Konstrukte wurden amplifiziert durch PCR unter Verwendung des KIAA0926  
EST-Klons aus dem Kazusa DNA Forschungsinstitut als „Template“. NALP1-PYD  
wurde amplifiziert mit JT1497 5'-  
15 ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-  
GATCCAGGGCATTAGCAC-3', NALP1-CARD wurde amplifiziert mit JT1500 5'-  
GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-  
GATGAGACTCTGGTGTGG-3'.

20 Amplifizierte Schnitt-Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (Invitrogen) ligiert und  
anschließend in die EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag-enthaltenden PCR-3  
(Invitrogen) abgeleiteten Vektoren (Thome et al., 1999) subkloniert. Andere  
Konstrukte, die verwendet wurden, entsprachen jenen, die bereits zuvor beschrieben  
worden sind (Thome et al., 1999) subkloniert.

25

Die Immunopräzipitierung wurde, wie zuvor beschrieben (Burns et al., 1998),  
durchgeführt. Kurz zusammengefasst, 293 T-Zellen wurden in DMEM-Medium, das  
mit 10%igem fötalen Kälberserumglutamin angereichert war, kultiviert, in einem  
Bereich von  $1-3 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Platte ausgesetzt und mit 3 µg der indizierten  
30 Konstrukte am nächsten Tag durch die Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode  
transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und in Lysepuffer lysiert (0,2% NP40, 150 mM  
NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,4) 24-26 Stunden nach der Transfektion. Die  
Zell-Lysate wurden für mindestens 3 Stunden auf Sepharose 6B (Pharmacia)

vorgereinigt, und zwar vor der Fällung von einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für vier Stunden mit 3 µl von Flag-Agarose (Kodak International Biotechnology) und 3 µl von Sepharose 6B-Perlen. Das Resin wurde 6x in Lysepuffer gewaschen und nach  
5 dem letzten Waschschrift wurden die gebundenen Proteine durch Kochen in Probenpuffer eluiert, durch SDS-Page separiert und auf Nitrocellulose (Hybond ECL, Pharmacia) für das nachfolgende Western-Blotting transferiert. Sowohl Anti-VSV- und Anti-Flag-Antikörper wurden von Sigma gekauft. Ein HRP-konjugierter Antikörper, der spezifisch die schwere Kette von IgG1 der Maus (Southern Biotechnology Associates)  
10 detektieren konnte, wurde eingesetzt.

## Referenzen

- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *TIBS*, 24, 47-53.
- Bertin, J., Nir, W.J., Fischer, C.M., Tayber, O.V., Errada, P.R., Grant, J.R., Keilty, J.J., Gosselin, M.L., Robison, K.E., Wong, G.H., Glucksmann, M.A. and DiStefano, P.S. (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 12955-8.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N. and Hofmann, K. (1996) A flexible search technique based on generalized profiles. *Computer Chem.*, 20, 3-24.
- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L. and Tschopp, J. (1998) MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.*, 273, 12203-12209.
- Centola, M., Aksentijevich, I. and Kastner, D.L. (1998) The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1581-8.
- Chen, X., Bykhovskaya, Y., Tidow, N., Hamon, M., Bercovitz, Z., Spirina, O. and Fischel-Ghodsian, N. (2000) The familial mediterranean fever protein interacts and colocalizes with a putative Golgi transporter. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 224, 32-40.
- Chou, J.J., Matsuo, H., Duan, H. and Wagner, G. (1998) Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell*, 94, 171-80.

- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L., Lenardo, M.J. and Fesik, S.W. (1998) NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 392, 941-5.
- FrenchFMFConsortium. (1997) A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat. Genet.*, 17, 25-31.
- Hofmann, K. (1999) The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55, 1113-28.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 155-156.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. and Fesik, S.W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 384, 638-41.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J. and Nunez, G. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 14560-7.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2000) Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ*, 7, 509-10.
- InternationalFMFConsortium. (1997) Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell*, 90, 797-807.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and

- Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 268, 10932-7.
- Koonin, E.V. and Aravind, L. (2000) The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *TIBS*, 25, 223-4.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S. and Nunez, G. (1998) ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5156-60.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T. and Sagara, J. (1999) ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 33835-8.
- McCarthy, J.V., Ni, J. and Dixit, V.M. (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 16968-16975.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Secondary structure prediction of all-helical proteins in two states. *Protein Eng.*, 6, 831-6.
- Stegh, A.H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhansel, C., Hofmann, T.G., Grummt, I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.*, 17, 5974-86.

Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P.,

Mattmann, C. and Tschopp, J. (1999) Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF-kappaB transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, 274, 9962-8.

Tidow, N., Chen, X., Muller, C., Kawano, S., Gombart, A.F., Fischel-Ghodsian, N. and Koeffler, H.P. (2000) Hematopoietic-specific expression of MEFV, the gene mutated in familial Mediterranean fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood*, 95, 1451-5.

Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. and Wagner, G. (1999) Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11265-70.

## FIGURLEGENDEN

**Fig. 5 (A)** Multiple Ausrichtung (Alignment) der Pyrin-Domäne. Position mit mehr als  
 5 50% identischen oder ähnlichen Aminosäuren sind auf schwarzem bzw. grauem  
 Hintergrund dargestellt. Die Speziesabkürzung ist wie folgt: HS, Homo sapiens und  
 DR, Danio rerio. Genebank/EMBL Zugangsnummern sind: AF310103 für humanes  
 Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1;  
 AF310106 für NALP2, AAF66964 für Zebrafisch CASPY, AAF66956 für Zebrafisch  
 10 Pycard. **(B)** Domänenstruktur der Proteine, die eine Pyrin-Domäne enthalten.  
 Homologie-Domänen werden wie folgt benannt: PYD für **P**yrin-**D**omäne, CARD für  
**C**aspase **R**ecruitment **D**omain; NACHT für NAIP, CIITA, HET-E und TP1-Domäne;  
 LRR für **L**eucine-**R**ich **R**epeats, SPRY für Domäne beim SPlä und **R**yanodine-  
 Rezeptor. B für B-Box. **(C)** Aminosäuresequenz von NALP1. Die verschiedenen  
 15 Schattierungen der Boxen entsprechen den Domänen wie in Figur 1B (4B) gezeigt.

**Fig. 6** Ausrichtung der repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD), Todeseffektordomänen  
 (DED), Caspaserekrutierungsdomänen (CARD) und Todesdomänen (DD); diese zeigt  
 die Ähnlichkeit dieser Interaktionsdomänen.  $\alpha$ -Linien indizieren die vorhergesagten  $\alpha$ -  
 20 Helices für PYD (Rost und Sander, 1993) und die indizierten  $\alpha$ -Helices bei den DD-,  
 CARD-, bzw. DED-Lösungsstrukturen (Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou  
 et al., 1999)

**Fig. 4** Pycard homodimerisiert mit Hilfe seiner PYD und interagiert mit PYD von  
 25 NALP1. Flag-markierte Konstrukte enthalten: PYD von Pycard (Pycard-PYD), RAIDD,  
 CARD von Apaf-1 (Apaf1-CARD), PYD von NALP1 (NALP1-PYD), CARD von  
 NALP1 (NALP1-CARD) und ein leerer Vektor (Mock-Vektor) wurden in 293 T-Zellen  
 mit einem VSV-markierten Pycard-Konstrukt-kotransfiziert. Die Zellen wurden 24  
 Stunden nach Transfektion lysiert und die Anti-Flag-Immunopräzipitate wurden im  
 30 Hinblick auf die Gegenwart von einem VSV-Pycard analysiert. Die Expression der  
 verschiedenen Konstrukte wurde in den Zell-Lysaten (untere Darstellung) analysiert.

## Ansprüche

5

1. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codiert, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele.  
10
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-2}$  ergibt, wenn die PYD-Domäne der DNA-Sequenz mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird.  
15
3. DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält.  
20
4. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine der in Figur 1 angegebenen (c)DNA-Sequenzen enthält.  
25
5. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen enthält.  
30
6. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.  
35

7. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert ist.
- 5
8. Wirtszelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Säugetierzelle, insbesondere eine humane Zelle, ist.
- 10
9. Aufgereinigtes Genprodukt, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 codiert wird.
- 15
10. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polypeptid ist.
- 20
11. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der in Figur 7 angegebenen Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate enthält.
- 25
12. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop auf einem Genprodukt nach einem der Ansprüche 9 bis 11 erkennt.
- 30
13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
- 35
14. Antikörper nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet ist.

15. Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen nach Anspruch 7 oder 8 unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen kultiviert werden und das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt wird.
16. Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert werden.
17. Verwendung einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines Genprodukts nach einem der Ansprüche 9 bis 11 zur Behandlung von Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer Signaltransduktion beruhen.
18. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt.
19. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um Psoriasis, Artherosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis handelt.
20. Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß sie die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung blockiert.

21. Verbindung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine organisch-chemische Verbindung mit  
einem Molekulargewicht von vorzugsweise < 3000 ist.
- 5
22. Verbindung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet,  
daß sie die Zellmembran durch Diffusion oder über  
membranöse Transportproteine passiert.
- 10
23. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 20 oder 21  
zur Behandlung von (bzw. zur Herstellung eines  
Arneimittels zur Behandlung von) Psoriasis,  
Artheriosklerose, bakterielle oder virale  
15 Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle  
oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie,  
multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma,  
Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder  
Osteoarthritis.
- 20

25

Fig. 1

1.1

.....

>Pyc.hs  
MGTKREAILKVLLENLTPEELKKFKMKLGTVPLREGFERIPRGALGQLD  
IVDLTDKLVASYEDYAAELVVAVLRDMRMLLEEAARLQRAA

>Pyc.cdna  
AGGAAAGGTAGGACCTGATGGCTCCAGGCCCTCGGAGGCTCAGAGGCGCAG  
GGCTGAGCCATGGGAACGAAGCGCGAGGCCATCCTGAAGGTGCTGGAGAAC  
CTGACACCGGAGGAGCTCAAGAAGTTCAAGATGAAGCTGGGGACGGTGCCG  
CTGCGCGAGGGCTTCGGGCGCATCCCGCGGGGCGCGCTCGGGCAGCTAGATA  
TCGTGGACCTCACCGACAAGCTGGTCGCCTCCTACTACGAGGACTACGCAGC  
CGAGCTCGTCGTGGCCGTGCTGCGCGACATGCGCATGTTGGAGGAGGCCGCA  
CGGCTGCAGCGGGCTGCGTGAGGGCCACTCTGAGCTGGAGGCGGGTCAAGG  
CAAAAGGAGTAATGCAACGCCTGTGAAGCCAGCCCCACGCGCGCACCAGTC  
GCGTAAGACAACAGCAGTGTCTCCACCTCGGGGACCAAGGACGCCTCCGTGC  
CTCCAGACCCCGCCTCCTCCAGCCCCTGCACCTGTCATTTATTCTTCCACTGCC  
CAATAAATATTTCATGGCAGACTTTAAAAAAAAAAAA

1.2

>Pyrin  
MAKTPSDHLLSTLEELVPYDFEFKFKLQNTSVQKEHSRIPRSQIQRARPVKMATLLVTTYGEEYAVQLT  
LQVLRRAINQRLLEELHRAAIQEYSTQENGTTDDSAASSSLGENKPRSLKTPDHPEGNEGNPRPYGGGAA  
SLRCSQPEAGRLSRKPLSKRREKASEGLDAQKPRTRSPALPGGRSPGPCRALEGGQAEVRLRRNASSA  
GRLQGLAGGAPGQKECRPFVYLPSPGKMRPRSLEVTISTGEKAPANPEILLTLEEKTAANLDSATEPRAR  
PTPDGGASADLKEGPGNPEHSVTGRPPDTAASPRCHAQEGDPVDGTCVRDSCSFPEAVSGHPQASGSRSP  
GCPRCQDSHERKSPGSLSPQPLPQCKRHLKQVQLLFCEHDDEPICLICSLSQEHQHRVRPIEEVALEHK  
KKIQKQLEHLKKLRKSGEEQSYGEEKAVSFLKQTEALKQVRQKLEQVYFLEQQEHEFFVASLEDVQOM  
VGQIRKAYDTRVSQDIALLDALIGELEAKECQSEWELLQDIGDILHRAKTVPVPEKWTPPQEIQKIQLL  
HQKSEFVEKSTKYFSETLRSEMEMFNVPELIGAQAHAVNVILDAETAYPNLIFSDDLKSVRLGNKWERLP  
DGPQRFDSCIIVLGSPSFLSGRRYWEVEVGDKTAWILGACKTSISRKGNMTLSPENGYWVIMMKENEYQ  
ASSVPPTRLLIKEPPKRVGIFVDYRVGSISFYNVITARSHIYTFASCSFSGPLQPIFSPGTRDGGKNTAPL  
TICPVGGQGP

>Pyrin.cdna  
GGAAGCCAGACAGCTGGCTCGAGCCTCTCTGCTCAGCACCATGGCTAAGACCCCTAGTGACCATCTGCT  
GTCCACCCCTGGAGGAGCTGGTGCCCTATGACTTCGAGAAGTTCAAGTTCAAGCTGCAGAACACCAGTGTG  
CAGAAGGAGCACTCCAGGATCCCCCGAGCCAGATCCAGAGAGCCAGGCCGGTGAAGATGGCCACTCTGC  
TGGTCACCTACTATGGGGAAGAGTACGCCGTGCAGCTCACCTGCAGGTCTGCGGGCCATCAACCAGCG  
CCTGCTGGCCGAGGAGCTCCACAGGGCAGCCATTAGGAATATTCCACACAAGAAAACGGCACAGATGAT  
TCCGAGCGTCCAGCTCCCTGGGGGAGAACAGCCAGGAGCCTGAAGACTCCAGACCACCCCGAGGGGA  
ACGAGGGGAACGGCCCTCGGCCGTACGGGGCGGAGCTGCCAGCCTGCGGTGCAGCCAGCCGAGGCCGG  
GAGGGGGCTGTGAGGAAGCCCTGAGCAAACGCAGAGAGAAGGCCTCGAGGGCCTGGACGCGCAGGGC  
AAGCCTCGGACCCGAGCCCGGCCCTGCGGGCGGGAGAAGCCCGGCCCTGCAGGGCGCTAGAGGGGG  
GCCAGGCCGAGGTCCGGCTGCGCAGAAACGCCAGCTCCGCGGGGAGGCTGCAGGGCTGGCGGGGGCGC  
CCCGGGCAGAAGGAGTGCAGGCCCTTCGAAGTGACCTGCCCTCGGGAAAGATGCGACCTAGAAGCCTT  
GAGGTACCATTTCTACAGGGGAGAAGGCGCCCGCAAATCCAGAAATTCTCCTGACTCTAGAGGAAAAGA  
CAGCTGCGAATCTGACTCGGCAACAGAACCCCGGGCAAGGCCCACTCCGATGGAGGGGCATCTGCGGA  
CCTGAAGGAAGGCCCTGGAATCCAGAACATTGCGTCACCGGAAGGCCACCAGACACGGCTGCGAGTCCC  
CGTGCCACGCCAGGAAGGAGACCCAGTTGACGGTACCTGTGTGCGTGATTCTGTCAGCTTCCCCGAGG  
CAGTTTCTGGGCACCCCGAGGCTCAGGCAGCGCTCACCTGGCTGCCCGCGTCCAGCATCCCATGA  
AAGGAAGAGCCCGGAAGCCTAAGCCCCAGCCCCCTGCCACAGTGTAAAGCGCCACCTGAAGCAGGTCCAG  
CTGCTCTTCTGTGAGGATCACGATGAGCCCATCTGCCTCATCTGCAGTCTGAGTCAGGAGCACCAGGCC  
ACCGGGTGCGCCCATTTGAGGAGGTGCGCCTGGAACACAAGAAGAAAATTAGAAGCAGCTGGAGCATCT

Forts. Fig. 1

GAAGAAGCTGAGAAAATCAGGGGAGGAGCAGCGATCCTATGGGGAGGAGAAGGCAGTGAGCTTTCTGAAA  
 CAAACTGAAGCGCTGAAGCAGCGGGTGCAGAGGAAGCTGGAGCAGGTGTACTACTTCTGGAACAGCAGG  
 AGCATTTCTTTGTGGCCTCACTGGAGGACGTGGGCCAGATGGTTGGGCAGATCAGGAAGGCATATGACAC  
 CCGCGTATCCCAGGACATCGCCCTGCTCGATGCGCTGATTGGGGAACCTGGAGGCCAAGGAGTGCCAGTCA  
 GAATGGGAACTTCTGCAGGACATTGGAGACATCTTGCACAGGGCTAAGACAGTGCCTGTCCCTGAAAAGT  
 GGACCACTCCTCAAGAGATAAAACAAAAGATCCAACTCCTCCACCAGAAGTCAGAGTTTGTGGAGAAGAG  
 CACAAAGTACTTCTCAGAAACCCCTGCGTTTCAGAAATGGAAATGTTCAATGTTCCAGAGCTGATTGGCGCT  
 CAGGCACATGCTGTTAATGTGATTTCTGGATGCAGAAACCGCTTACCCCAACCTCATCTTCTCTGATGATC  
 TGAAGAGTGTTAGACTTGGAAACAAGTGGGAGAGGCTGCCCTGATGGCCCGCAAAGATTGACAGCTGTAT  
 CATTGTTCTGGGCTCTCCGAGTTTCTCTCTGGCCGCCGTTACTGGGAGGTGGAGGTTGGAGACAAGACA  
 GCATGGATCCTGGGAGCCTGCAGACATCCATAAGCAGGAAAGGGAACATGACTCTGTGCGCCAGAGAATG  
 GCTACTGGGTGGTGATAATGATGAAGGAAAATGAGTACCAGGCGTCCAGCGTTCCCGCCAGCCCGCTGCT  
 AATAAAGGAGCCTCCCAAGCGTGTGGGCATCTTCGTGGACTACAGAGTTGGAAGCATCTCCTTTTACAT  
 GTGACAGCCAGATCCACATCTATACATTGCCAGCTGCTCTTTCTCTGGGCCCTTCAACCTATCTTCA  
 GCCCTGGGACACGTGATGGAGGGAAGAACACAGCTCCTCTGACTATCTGTCCAGTGGGTGGTCAGGGGCC  
 TGAAGTGAATGCCCAACACTGCATCTCTCTCTGCTTCTGGCCTTGTATCTTGCATTACACTCAATAGT  
 CACGGAATGCCGACTAGGTGCTAGCTGCTATGGGAAATGCAAAAATAACAAAATAGTTACTGTGCCACG  
 GAGCCTACCCGATTATAGCAGAGGTAAGTTAGGAACGAACATGTTAGTCAATCCGGGTGAAGACATGTAC  
 TGATGACACACCATGGATTTCAGAGGAGGAAGTACGGAGTGGTTGCATAATCCGCCCTGGTGGGTGGCA  
 CTCTCAGGTGCTCCTGAACAGAAGATTGGCCCTCATTTCCCTCAGAACCCACGCAAGGATATATGT  
 CCCTTGTCTCTCTGCTTCTGCTTTGAGGATATGGGAAGCCTAGAGAAACGCAAGCAGACTGGATTGGG  
 ATAGAAGTATTTGTGTACCTGGATTAAATGAATATGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACCAATCTTGC  
 TCTGTGGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCAGGTTCAAGC  
 GATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGCAGCTGGGATTACAGGTGCGTGCCACCACACAGGCTGGTTTTCT  
 TGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTAGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGA  
 TCCACCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCCCCGCGCTATGATTCTT  
 TTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCAAAGTTTTGCTCTTGTCAACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGAATCTTGG  
 CTCACCTGCAACCTCCGCTCCAGGTTCAAGAGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCGAAGTAGCTGGGATTAC  
 AGCGCCCCGCCACCATGCCCGCTAATTTTTTGCAATTTTAGTAGACATGAGGTTTCATCATGTTGGCCA  
 GGCGGCTCTCAAACCTCCTGACCTCAGGTGATGCACCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCAGGATTACAGGC  
 ATGAGCCACCATGCCTGGCCATGATTCCTAAGAGAATTGACTGGGCTCATGAATAAAAAAATTAGAAAA

A.3

&gt;Pycard

MGRARDAILDALENLTAEELKFKLKL SVPLREGYGRIPRGALLSMDALDLTDKLVSFYLETYGAELTA  
 NVLRDMGLQEMAGQLQAATHQSGAAPAGIQAPPQSAKPLHFIDQHRAALIA RVNTNVEWL LDALYGV  
 LTDEQYQAVRAEPTNPSKMRKLFSFTPAWNWTKDLLLLQALRESQSYLVEDLERS

&gt;Pycard.cdna

GTCCAGGTTCCGCCCCGAGCCGACTTCTCCTGGTCCGCGGCTGCAGCGGGTGAGCGGCGGCAGCGGC  
 CGGGGATCCTGGAGCCATGGGGCGCGCGCGCAGCCATCCTGGATGCGCTGGAGAACCTGACCGCCGAG  
 GAGCTCAAGAAGTTCAAGCTGAAGCTGCTGTCGGTGCCGCTGCGCGAGGGCTACGGGCGCATCCCGCGG  
 GCGCGCTGCTGTCATGGACGCTTGGACCTCACCGACAAGCTGGTCAGCTTCTACCTGGAGACCTACGG  
 CGCCGAGCTCACCGCTAACGTGCTGCGGACATGGGCTGCAGGAGATGGCCGGGCGAGCTGCAGGCGGCC  
 ACGCACCAAGGCTCTGGAGCCGCGCCAGCTGGGATCCAGGCCCTCCTCAGTCGGCAGCCAAGCCAGGCC  
 TGCATTTTATAGACCAGCACCGGGCTGCGCTTATCGCGAGGTCACAAACGTTGAGTGGCTGCTGGATGC  
 TCTGTACGGAAGGTCTGACGGATGAGCAGTACCAGGCAGTGCAGGCGGAGCCCAACCAACCAAGCAAG  
 ATGCGGAAGCTCTTCACTTTCACACCGCCTGGAACCTGGACCTGCAAGGACTTGCTCCTCCAGGCCTAA  
 GGGAGTCCAGTCTTACCTGGTGGAGGACCTGGAGCGGAGCTGAGGCTCCTTCCAGCAACACTCCGGTC  
 AGCCCCCTGGCAATCCACCAATCATCCTGAATCTGATCTTTTATACACAATATACGAAAAGCCAGCTT  
 GAAAAA

A.4

&gt;NALP1.hs

MAGGAWGRILACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSGETPAQPEKTSMEVASYLVAQYGEQRAWDLA  
 LHTWEQMLRLSLCAQAQEGAGHSPSPFPSPSEPHLGSPTSSTAVLMPWIHELPAAGCTQGSERRVLRQL

Forts. Fig. 1

PDTSGRRWREISASHLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTSTAVLGSWGSPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDE  
 TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAADVGTTPQAHSSLQPHHPWEPSVRESLCTWPWKNEFDNQKFTQ  
 LLLQRPHPRSQDPLVKRSWPDYVEENRGHLIEIRDLFGPGLDTQEPRIIVILQGAAGIGKSTLARQVKEA  
 WGRGQLYGDRFQHVYFYSRELAQSKVVSLELIGKDGATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQ  
 EPSSELCLHWSQPQPADALLGSLGKTIPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSSESSRKEYF  
 YRYFTDERQAIRAFRLVKSNEKLWALCLVPVWSLACTCLMQQMRKEKLTLSKTTTTLCLHYLAQALQ  
 AQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKTLFSPDDLRLKHGLDGAIISTFLKMGILQEHPIPLSYSFHLCFQEFF  
 AAMSYVLEDEKGRGKHSNCIIDLEKTLAYGIHGLFGASTTRFLLGLLSDEGEREMENIFHCRLSQGRNL  
 MQWVPSLQLLLQPHSLESLEHCLYETRNKTLTQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKLQLI  
 EGRQHRSTWSPSMVVLFRWVPVTDAYWQILFVSVLKVTRNLKELDLSGNSLSHSAVKSLCKTLRRPRCLLE  
 TLRLAGCGLTAEDCKDLAFLGRANQTLTELDSLNFVMDAGAKHLQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLTSDC  
 QDLASVLSASPFLKELDLQNNLDVGVRLCEGLRHPACKLIRLGLDQTTLSDEMRELRALEQEKPO  
 LLIFSRKPSVMTPIEGLDTGEMSNSTSSLRQRRLGSEARAASHVAQANLKLIDVSKIPIAEIAEESP  
 VVPVELLCVPSPASQDGLHTKPLGTDDDFWGPTGPVATEVVDKENLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVVR  
 EAVTVEIEFCVWDQFLGEINQHSWMVAGPLLDIKAEPGAWEAVHLPHFVALQGGHVDTSLSFQVAHFKEE  
 GMLLEKPARVELHHIVLENPSPSPLGVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRLHPEEVTFHLYLIPSDCSIR  
 KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLSGIRLQVKDKDETLEVWALVKPGDLMPTTLIPACIAVPSPLD  
 APQLLHFVDQYREQLIARVTSVEVLDKLHGQVLSQEQYERVLAENTRPSQMRKLFSLSQSWDRCKDGL  
 YQALKETHPHLIMELWEKSGSKGLPLSS

&gt;NALP1.cdna

TGGGAGCCAGCAGCCCGGGGGCTCCACTCTGGGTTCTGAAAGCCCATTCCTGCTCTGCGGCTCCTCCCA  
 CCCCACCTCTCTCAGCCTTGACGCTCAAGGTTGATCTCAGGAGTCCAGGACCCAGGAGAGGAAGAAT  
 CTGAGGAACACAGAAACAAGATGGCTGGCGGAGCCTCGGGCCGCTGCTTACTTGGAGTTCTGAAAG  
 AAGGAGGAGCTGAAGGAGTTCAGCTTCTGCTCGCCAATAAAGCGCACTCCAGGAGCTCTTCGGGTGAGA  
 CACCCGCTCAGCCAGAGAAGACGAGTGGCATGGAGTGGCCTCGTACCTGGTGGCTCAGTATGGGAGCA  
 GCGGGCCTGGGACCTAGCCCTCCATACCTGGGAGCAGATGGGGCTGAGGTCACTGTGCGCCCAAGCCAG  
 GAAGGGGCAGGCCACTCTCCCTCATTCCCTACAGCCCAAGTGAACCCACCTGGGGTCTCCAGCCAAAC  
 CCACCTCCACCGCAGTGCTAATGCCCTGGATCCATGAATTGCCGGCGGGGTGCACCCAGGGCTCAGAGAG  
 AAGGGTTTTGAGACAGCTGCCTGACACATCTGGACGCCGCTGGAGAGAAATCTCTGCCTCACACCTCTAC  
 CAAGCTCTTCCAAGCTCCCCAGACCATGAGTCTCCAAGCCAGGAGTCAACCAACGCCCCACATCCACAG  
 CAGTGTGGGGAGCTGGGGATCCCCACCTCAGCCAGCCTAGCACCCAGAGAGCAGGAGGCTCTCTGGGAC  
 CCAATGGCCTCTGGATGAAACGTCAGGAATTTACTACACAGAAATCAGAGAAAGAGAGAGAGAAATCA  
 GAGAAAGGCAGGCCCCCATGGGCAGCGGTGGTAGGAACGCCCCACAGGCGCACAGCAGCCTACAGCCCC  
 ACCACCACCCATGGGAGCCTTCTGTGAGAGAGAGCCTCTGTTCCACATGGCCCTGGAAAAATGAGGATTT  
 TAACCAAAAATTCACACAGCTGTCTACTTCTACAAAGACCTCACCCAGAAGCCAGATCCCCTGGTCAAG  
 AGAAGCTGGCCTGATTATGTGGAGGAGAATCGAGGACATTTAATTGAGATCAGAGACTTATTTGGCCAG  
 GCCTGGATACCCCAAGAACCTCGCATAGTCATGCAAGGGGCTGTCTGGAATTGGGAAGTCAACACTGGC  
 CAGGCAGGTGAAGGAAGCCTGGGGGAGAGCGCAGCTGTATGGGGACCGCTTCCAGCATGCTTCTACTTC  
 AGCTGCAGAGAGCTGGCCAGTCCAAGGTGGTGAATCTCGCTGAGCTCATCGGAAAAGATGGGACAGCCA  
 CTCCGGCTCCCATTAGACAGATCCTGTCTAGGCCAGAGCGGCTGCTCTTCATCCTCGATGGTGTAGATGA  
 GCCAGGATGGGTCTTGACAGGAGCCGAGTTCTGAGCTCTGTCTGCACTGGAGCCAGCCACAGCCGCGGAT  
 GCACTGTCTGGGCAGTTTGCTGGGGAATACTACTTCCCAGGCATCCTTTCTGATCAGGCTCGGACCA  
 CAGCTCTGCAGAACCTCATTCCTTCTTGGAGCAGGCAGTTGGGTAGAGGTCTCGGGTTCTCTGAGTC  
 CAGCAGGAAGGAATATTTCTACAGATATTTACAGATGAAAGGCAAGCAATTAGAGCCTTTAGGTTGGTC  
 AAATCAAAACAAAGAGCTCTGGGCCCTGTGTCTTGTCCTTGGGTGTCTGGCTGGCCTGCACCTGCCTGA  
 TGCAGCAGATGAAGCGGAAGGAAAACTCACACTGACTTCCAAGACCACCACAACCTCTGTCTACATTA  
 CCTTGCCAGGCTCTCCAAGCTCAGCCATTGGGACCCAGCTCAGAGACCTCTGCTCTCTGGCTGTGAG  
 GGCATCTGGCAAAAAAGACCCCTTTTCACTCCAGATGACCTCAGGAAGCATGGGTAGATGGGGCCATCA  
 TCTCCACCTTCTTGAAGATGGGTATTCTTCAAGAGCACCCCATCCCTCTGAGCTACAGCTTCACTCACCT  
 CTGTTTCCAGGAGTTCTTGCAGCAATGTCCTATGCTTGGAGGATGAGAAGGGGAGAGGTAACATTCT  
 AATTGCATCATAGATTTGAAAAGACGCTAGAAGCATATGGAATACATGGCCTGTTTGGGGCATCAACCA  
 CAGTTTCTTATTGGCCCTGTAAAGTGTAGGGGGAGAGAGAGATGGAGAACATCTTCACTGCCGGCT  
 GTCTCAGGGGAGGAACCTGATGCAGTGGGTCCGCTCCCTCAGCTGCTGCTGCAGCCACACTCTCTGGAG  
 TCCCTCCACTGCTTGTATGAGACTCGGAACAAAACGTTCTTGACACAAGTGATGGCCATTTTGAAGAAA  
 TGGGCATGTGTAGAAAACAGACATGGAGCTCTTAGTGTGCACTTTCTGCATTAAATTCAGCCGCCACGT  
 GAAGAAGCTTCAGCTGATTGAGGGCAGGCAGCACAGATCAACATGGAGCCCAAGCATGGTAGTCTGTTC  
 AGGTGGGTCCAGTCACAGATGCCTATTGGCAGATTCTTCTCTCGTCTCAAGTCAACAGAAACCTGA

Forts. Fig. 1

AGGAGCTGGACCTAAGTGGAACTCGCTGAGCCACTCTGCAGTGAAGAGTCTTTGTAAGACCCTGAGACG  
 CCCTCGCTGCCTCCTGGAGACCCTGCGGTTGGCTGGCTGTGGCTCACAGCTGAGGACTGTAAGGACCTT  
 GCCTTTGGGCTGAGAGCCAACAGACCCTGACCGAGCTGGACCTGAGCTTCAATGTGCTCATGGATGCTG  
 GAGCCAAACACCTTTGCCAGAGACTGAGACAGCCGAGCTGCAAGCTACAGCGACTGCAGCTGGTCAGCTG  
 TGGCCTCACGTCTGACTGCTGCCAGGACCTGGCCTCTGTGCTTAGTGCCAGCCCAGCCTGAAGGAGCTA  
 GACCTGCAGCAGAACAACCTGGATGACGTTGGCGTGCGACTGCTCTGTGAGGGGCTCAGGCATCCTGCCT  
 GCAAACCTCATACGCCTGGGGCTGGACCAGACGACTCTGAGTGATGAGATGAGGCAGGAGCTGAGGGCCCT  
 GGAGCAGGAGAAGCCTCAGCTGCTCATCTTCAGCAGACGGAACCAAGTGTGATGACCCCTATTGAGGGC  
 CTGGATACGGGAGAGATGAGTAATAGCACATCCTCACTCAAGCGGCAGAGACTCGGATCAGAGAGGGCGG  
 CTTCCCATGTTGCTCAGGCTAATCTCAAACCTCCTGGACGTGAGCAAGATCTTCCCAATTGCTGAGATTGC  
 AGAGGAAAGCTCCCAGAGGTAGTACCGGTGGAACCTTTGTGCGTGCCCTTCTCCTGCCTCTCAAGGGGAC  
 CTGCATACGAAGCCTTTGGGGAAGTACGATGACTTCTGGGGCCCCACGGGGCCTGTGGCTACTGAGGTAG  
 TTGACAAAAGAAAAGAACTTGTACCGAGTTCACCTCCCTGTAGCTGGCTCCTACCGCTGGCCCAACAGGG  
 TCTCTGCTTTGTGGTGAGAGAAGCGGTGACCGTTGAGATTGAATTCTGTGTGTGGGACCAGTTCCTGGGT  
 GAGATCAACCCACAGCACAGCTGGATGGTGGCAGGGCCTCTGCTGGACATCAAGGCTGAGCCTGGAGCCG  
 TGAAGCTGTGCACCTCCCTCACTTTGTGGCTCTCCAAGGGGCCATGTGGACACATCCCTGTTTCCAAGT  
 GGCCCACTTTAAAGAGGAGGGGATGCTCCTGGAGAAGCCAGCCAGGGTGGAGCTGCATCACATAGTTCTG  
 GAAAACCCAGCTTTTCCCTTGGGAGTCTCCTGAAAATGATCCATAATGCCCTGCGCTTCAATCCCG  
 TCACCTCTGTGGTGTGCTTACCACCGCTCCATCCTGAGGAAGTACCTTCCACCTTACCTGATCCC  
 AAGTGACTGCTCCATTCGGAAGGAAGTGGAGCTCTGCTATCGAAGCCCTGGAGAAGACCAGCTGTTCTCG  
 GAGTTCTACGTTGGCCACTTGGGATCAGGGATCAGGCTGCAAGTGAAGACAAGAAAGATGAGACTCTGG  
 TGTGGGAGCCCTTGGTGAAGACAGGAGATCTCATGCCCTGCAACTACTCTGATCCCTCCAGCCTGCATAGC  
 CGTACCTTCACTCTGGATGCCCCGAGTTGCTGCACTTTGTGGACCAGTATCGAGAGCAGCTGATAGCC  
 CGAGTGACATCGGTGGAGGTTGTCTTGGACAACTGCATGGACAGGTGCTGAGCCAGGAGCAGTACGAGA  
 GGGTGCTGGCTGAGAACACGAGGCCAGCCAGATGCGGAAGCTGTTAGCTTGGCCAGTCTGGGACCG  
 GAAGTGCAAGATGGACTCTACCAAGCCCTGAAGGAGACCCATCCTCACCTCATTATGGAACCTCTGGGAG  
 AAGGGCAGCAAAAAGGGACTCCTGCCACTCAGCAGCTGAAGTATGAACACCAGCCCTTGACCTTGAGTC  
 CTGGCTTTGGCTGACCCTTCTTGGGTCTCAGTTTCTTCTCTGCAACAAGTTGCCATCTGGTTTGCCT  
 TCCAGCACTAAAGTAATGAACTTTGATGATGCCTTTGCTGGGCATTATGTGTCCATGCCAGGGATGCCA  
 CAGGGGGCCCCAGTCCAGGTGGCCTAACAGCATCTCAGGGAATGTCCATCTGGAGCTGGCAAGACCCCTG  
 CAGACCTCATAGAGCCTCATCTGGTGGCCACAGCAGCCAAGCCTAGAGCCCTCCGATCCCATCCAGGCG  
 CAAAGAGGAATAGGAGGACATGGAACCATTTGCCCTCTGGCTGTGTACAGGGTGAGCCCCAAAATTGGG  
 GTTCAGCGTGGGAGGCCACGTGGATTCTTGGCTTTGTACAGGAAGATCTACAAGAGCAAGCCAAACAGAGT  
 AAAGTGAAGGAAGTTTATTCAGAAAATAAAGGAGTATCACTGCTCTTTTGAATTTGTCTAGCAGACTT  
 TCCAGTTTACCAGAAAACCCCTATAAATTAAAAATTTTACTTAAATTTAAGAATTAAAAAATAACA  
 AAAAAGAAAAATGAAAAATAAGGAATAAGAAGTTAAAAA

.....

1.5

&gt;NALP2/Py7.hs

MVSSAQMGFNLQALLEQLSQDELKFKYLITTFSLAHELQKIPHKEVDKADGKQLVETLTHCDSYWVEMA  
 SLQVFEEKMRMDLSERAKDEVREAALKSFNKRKPLSLGITRKRPPLDVDEMLERFKTEAQAFTETKGNVI  
 CLGKEVFKGKKPKDNRCRYILKTKFREMWKSWPGDSKEVQVMAERYKMLIPFSNPRVLPGPFYTVVLYG  
 PAGLGKTTLAQKLMLDWAEDNLIHKFYAFYLSRELSRLGPCSFAELVFRDWPQLQDDIPHILAQARKIL  
 FVIDGFDELGAAPGALIEDICGDWEKKKFPVVLGSLNLRVMLPKAALLVTRPRALRDLRLIAEPIYIR  
 VEGFLEEDRRAYFLRHFGDEDQAMRAFELMRSNAALFQLGSAPAVCWI VCTTLKLQMEKGEDPVPTCLTRT  
 GLFLRFLCSRFPQGAQLRGALRTLSLLAAQGLWAQTSVLHREDLERLGVQESDLRLFLDGDILRQDRVSKG  
 CYSFIHLSFQQFLTALFYTLEKEEEDRDGHTWDIGDVQKLLSGVERLRNPDLIQAGYYSFGLANEKRAKE  
 LEATFGCRMSPDIKQELLRCDISCKGGHSTVTDLQELLGCLYESQEEELVKEVMAQFKEISLHLNAVDVVP  
 SSFCVKHCRNLQKMSLQVIKENLPENVTASESDAEVERSDQDQHMLPFWTDLCSIFGSNKDLMGLAINDSF  
 LSASLVRIICEQIASDTHLQRVVFKNISPADAHRLCLALRGHKTVTYTLTQGNQDDMFALCEVLRHP  
 ECNLRYLGLVSCSATQQWADLSLAEVNSQLTCVNLSDNELLDEGAKLLYTLRHPKCFQLRSLLENCHL  
 TEANCKDLAALVVSRELTHLCLAKNPIGNTGKFLCEGLRYPECKLQTLVLWNCIDITSDGCCDLTKLLQE  
 KSSLLCLDLGLNHI GVKGMKFLCEALRKPLCNRLWLWGCSPFSCEDLCSALSCNQLSVTLDLGQNPL  
 GSSGVKMLFETLTCSGTLRLRLKIDDFNDELNKLLEEIEKNPQLI IDEKHPWAERPSSHDFMI

&gt;NALP2Py7.dna

Forts. Fig. 1

AAAAACTTATTAGAGCTTTCTCAACCTGCAGCCCTCATCTCCGCCGGCGAGTAGGGCCAGGTGTTGGGAGC  
 TCCACGATGGGACAAGATGGTGTCTTCGGCGCAGATGGGCTTCAACCTGCAGGCTCTCTGGAGCAGCTCA  
 GCCAGGATGAGTTGAGCAAGTTCAAGTATCTGATCACGACCTTCTCCCTGGCACACGAGCTCCAGAAGATC  
 CCCACAAGGAGGTAGACAAGGCTGATGGGAAGCAACTGGTAGAAATCTCACCACCCATTGTGACAGCTA  
 CTGGGTGGAGATGGCGAGCCTCCAGGTCTTTGAAAAGATGCACCGAATGGATCTGTCTGAGAGAGCAAAGG  
 ATGAAGTCAGAGAAGCAGCTTTGAAATCCTTTAATAAAAGGAAACCTCTATCATTAGGGATAACACGGAAA  
 GAACGACCACCTCTAGACGTGGACGAAATGCTGGAGCGCTTCAAAACAGAAGCACAAAGCGTTTACAGAAAC  
 GAAAGGAAATGTCTGCTGGGTAAAGAAGTCTTTAAAGGAAAAAGCCAGACAAAGACAATAGGTGCA  
 GGTATATATTGAAGACGAAGTTCCGGGAGATGTGGAAGAGCTGGCCTGGAGATAGCAAAGAGGTCCAGGTT  
 ATGGCTGAGAGATACAAGATGCTGCCATTTCAGCAACCCAGGGTGCTTCCCGGCCCTTCTCATACAC  
 GGTGGTGTCTGTATGGTCTGCAGGCCTTGGGAAAACCACGCTGGCCCAGAACTAATGCTAGACTGGGCAG  
 AGGACAACCTCATCCACAAATTCAAATATGCGTTCTACCTCAGCTGCAGGGAGCTCAGCCGCTGGGCCCG  
 TGCAGTTTTCAGAGCTGGTCTTCAGGGACTGGCCTGAATTGCAGGATGACATTCACACATCCTAGCCCA  
 AGCAGCGAAATCTTGTTCTGTGATTGACGGCTTTGATGAGCTGGGAGCCGACCTGGGGCGCTGATCGAGG  
 ACATCTGCGGGGACTGGGAGAAGAAGAAGCCGGTGCCGCTCCTCCTGGGGAGTTTGTCTGAACAGGGTGATG  
 TTACCCAAGGCCGCCCTGCTGGTCACCACGCGGCCAGGGCCCTGAGGGACCTCCGGATCCTGGCGGAGGA  
 GCCGATCTACATAAGGGTGGAGGGCTTCTGGAGGAGGACAGGAGGGCTATTTCTTGAGACACTTTGGAG  
 ACGAGGACCAAGCCATGCGTGCTTTGAGCTAATGAGGAGCAACGCGGCCCTGTTCCAGCTGGGCTCGGCC  
 CCGCGGTGTGTGGATCGTGTGCAGACTCTGAAGCTGCAGATGGAGAAGGGGAGGACCCGGTCCCCAC  
 CTGCCCTCACCCGCACGGGGCTGTCTCCTGCGTTTCTCTGTCAGCCGGTTCGCCGACGGCGCACAGCTCGCGG  
 GCGCGCTGCGGACGCTGAGCCTCCTGGCCGCGCAGGGCCTGTGGGCGCAGACGTCCGTGCTTACCAGAGAG  
 GATCTGGAAGGCTCGGGGTGCAGGAGTCCGACCTCCGTCTGTTCTTGACGGAGACATCCTCCGCCAGGA  
 CAGAGTCTCAAAGGCTGCTACTCCTTCATCCACCTCAGCTTCCAGCAGTTTCTCACTGCCCTGTTCTACA  
 CCTTGGAGAAGGAGGAGGAAGAGGATAGGGACGGCCACACCTGGGACATTGGGGACGTACAGAAGCTGCTT  
 TCCGGAGTAGAAAGACTCAGGAACCCCGACCTGATCCAAAGCAGGCTACTACTCCTTTGGCCTCGCTAAGCA  
 GAAGAGAGCCAAGGAGTTGGAGGCCACTTTGGCTGCCGGATGTCAACCGACATCAAACAGGAATTGCTGC  
 GATGCGACATAAGTTGTAAAGGTTGACATTCAACGGTGACAGACCTGCAGGAGCTCCTCGGCTGTCTGTAC  
 GAGTCTCAGGAGGAGGAGCTGGTGAAGGAGGTGATGGCTCAGTTCAAAGAAATATCCTGCACTTAAATGC  
 AGTAGAGTTGTGCCATCTTCATTCTGCGTCAAGCACTGTGCAACCTGCAGAAATGTCACTGCAGGTAA  
 TAAAGGAGAATCTCCCGGAGAATGTCACTGCGTCTGAATCAGACGCCGAGGTTGAGAGATCCCAGGATGAT  
 CAGCACATGCTTCTTCTGACGACCTTTGTTCCATATTTGGATCAAATAAGGATCTGATGGGTCTAGC  
 AATCAATGATAGCTTTCTCAGTGCTCCTTAGTAAGGATCCTGTGTGAACAAATAGCCTCTGACACCTGTC  
 ATCTCCAGAGAGTGGTGTTCAAAAACATTTCCCCAGCTGATGCTCATCGGAACCTCTGCCTAGCTCTTCGA  
 GGTCAACAAGACTGTAACGTATCTGACCTTCAAGGCAATGACCAGGATGATATGTTTCCCGCATTGTGTGA  
 GGTCTTGAGACATCCAGAATGTAACCTGCGATATCTCGGGTTGGTGTCTTGTTCCGCTACCACTCAGCAGT  
 GGGCTGATCTCTCCTTGGCCCTTGAAGTCAACCAGTCCCTGACGTGCGTAAACCTCTCCGACAATGAGCTT  
 CTGGATGAGGGTGCTAAGTTGTGTACACAACCTTTGAGACACCCCAAGTGCTTTCTGAGAGGTTGTCTGT  
 GGAAACTGTACCTTACAGAAGCCAATTGCAAGGACCTTGCTGCTGTGTTGGTTGTCAGCCGGGAGCTGA  
 CACACCTGTGCTTGGCCAAGAACCCCATTTGGGAATACAGGGGTGAAGTTTCTGTGTGAGGGCTTGAGGTAC  
 CCCGAGTGTAAGTGCAGACCTTGGTGTCTTGAAGTGCAGACATAACTAGCGATGGCTGCTGCGATCTCAC  
 AAAGCTTCTCCAAGAAAAATCAAGCCTGTTGTGTTTGGATCTGGGGCTGAATCACATAGGAGTTAAGGGAA  
 TGAAGTTCTGTGTGAGGCTTTGAGGAAACCACTGTGCAACTTGAGATGTCTGTGGTTGTGGGGATGTTC  
 ATCCCTCCGTTCAAGTTGTGAAGACCTCTGCTCTGCCCTCAGCTGCAACCAGAGCCTCGTCACTCTGGACCT  
 GGGTCAGAATCCCTTGGGGTCTAGTGGAGTGAAGATGCTGTTTGAACCTTGACATGTTCCAGTGGCACCC  
 TCCGGACACTCAGGTTGAAAAATAGATGACTTAAATGATGAAGTCAATAAGCTGCTGGAAGAAATAGAAGAA  
 AAAAACCACAACTGATTATTGATACTGAGAAACATCATCCTGGGCAGAAAGGCCCTTCTTCTCATGACTT  
 CATGATCTGAATCCCCCGAGTCATTCTCATCTCATGAAGTCAATGATTTTCCAGGTGTTGGTGAAGTCC  
 TGTGACTCCTCTCCTCCCCGGCCCCCTACCCCTCAGGATAATGAGTTTCATTGCTGGGCTAGATGTTTATAGC  
 CATGATTTCTGCTCTGTTTTTATACCTGCACACATCCTTATCTTTGTACATATGAAATATCTGTATCACGG  
 GTATATTGAGAGAAATAAAGGTGAGAGCATTCACAAAAA

1.6

&gt;NALP3/PY5.hs

MLRTAGRDGL CRLSTYLEEL EAVELKKFKL YLGATTELGE GKIPIWGSMEK AGPLEMAQLL  
 ITHFGPEEAW RLALSTFERI NRKDLWERGQ REDLVRDPQE TYRDYVRRKF RLMDRNARL  
 GECVNLSHRY TRLLLVEKHS NPMQVQQQLL DTGRGHARTV GHQASPIKIE TLFEPDEERP

Forts. Fig. 1

EPPRTVVMQG AAGIGKSMLA HKVMLDWDAG KLFQGRFDYL FYINCREMNQ SATECSMQDL  
 IFSCWPEPSA PLQELIRVPE RLLFIIDGFD ELKPSFHDPQ GPWCLCWEK RPTTELLNSL  
 IRKKLLPELS LLITTRPTAL EKLHRLLEHP RHVEILGFSE AERKEYFYKY FHNAEQAGQV  
 FNYVRDNEPL FTMCFVPLVC WVVCTCLQQQ LEGGGLLRQT SRTTTAVYML YLLSLMQPKP  
 GAPRLQPPPN QRGCLSLAAD GLWNQKILFE EQDLRKHGLD GEDVSAFLNM NIFQKDINCE  
 RYYSFIHLSF QEFAAMYI LDEGEAGGAP DQDVTRLLTE YAFSERSFLA LTRSFLFGLL  
 NEETRSHLEK SLCWKVSPHI KMDLLQWIS KAQSDGSTLQ QGSLEFFSCL YEIQEEEFIQ  
 QALSHFQVIV VSNIAKMEH MVSSFCLKRC RSAQVLHLYG ATYSADGEDR ARCSAGAHTL  
 LVQLRPERTV LLDAYSEHLA AALCTNPNI ELSLYRNALG SRGVKLLCQG LRHPNCKLQN  
 LRLKRCRISS SACEDLSAAL IANKNLTRMD LSGNGVGFPG MMLLCEGLRH PQCRLOMIQL  
 RKCQLESGAC QEMASVLGTN PHLVELDLTG NALEDLGLRL LCQGLRHPVC RLRLWLKIC  
 RLTAACDEL ASTLSVNQSL RELDLSLNL GDLGVLLLC E GLRHPTCKLQ TLRLGICRLG  
 SAACEGLSVV LQANHNREL DLSFNDLGDW GLWLLAELQ HPACRLQKLW LDSCGLTAKA  
 CENLYFTLGI NQTLTDLYLT NNALGDTGVR LLCKRLSHPG CKLRVLWLF MDLNMKTHSF  
 PEPLQPDVAV DLYPRQFPAG NRNHLRFSSC RRPSTASVD MGVTGDAQMS QHFPLGHQNS  
 APHLRPTGQL REYVLNLSG

&gt;NALP3/PY5.dna

atgctacgaaccgcagggcagggacggcctctgtcgccctgtccacacttggagaagaactc  
 gaggtctgtggaactgaagaagtcaagttatacctggggaccgcgacagagctgggagaa  
 ggcaagatccccctggggaagcatggagaagccgggtccccctggaaatggccagctgctc  
 atcaccactctcgggcccagaggaggcctggaggttggtctctcagcacctttgagcggata  
 aacaggaaggacctgtgggagagaggacagagagaggacctggtagggatccccaggaa  
 acctacagggactatgtccgcaggaaattccggctcatggaagaccgcaatgcgcgccta  
 ggggaatgtgtcaacctcagccaccgggtacaccggctcctgctggtgaaggagcactca  
 aaccccatgcaggtccagcagcagcttctggacacagccgggacacgcgagggaccgtg  
 ggacaccaggctagccccatcaagatagagaccctctttgagccagacgagggagcgcctc  
 gagccaccgcgcaccgtggtcatgcaaggcgcgcgagggataggcaagtccatgctggca  
 cacaaggtgatgctggactggcgagcgggaagctcttccaaggcagatttgattatctc  
 ttctacatcaactgcagggagatgaaccagagtgcacggaatgcagcatgcaagacctc  
 atcttcagctgctggcctgagcccgccctctccaggagctcatccgaggtcccgag  
 cgctcctctttcatcatcgacggcttcgatgagctcaagcctcttttccacgatacctcag  
 ggaccttggtgctctgctgggaggagaaacggcccacggagctgcttcttaacagctta  
 attcggagaagctgctccccgagctatctttgctcatcaccacacggccccacggctttg  
 gagaagctccaccgctctgctggagcaccacccagggatgtggagatcctgggcttctctgag  
 gcagaaaggaaggaataacttctacaagtatctccacaatgcagagcagggcgggccaagt  
 tccaattacgtgagggacaacgagcctctcttcacatgtgcttcgctccccctgggtgtgc  
 tgggtggtgtgtacctgctccagcagcagctggagggtggggggctgttgagacagacg  
 tccaggaccaccactgcagtgatcatgctctacctgctgagctgagtgcaaccaagccg  
 ggggccccgcgcctccagccccaccacaaccagagagggttggtgctccttggcggcagat  
 gggctctggaatcagaaaatcctatttgaggagcaggacctccggaagcagggcctagac  
 ggggaagacgtctctgcttctcaacatgaacatcttccagaaggacatcaactgtgag  
 aggtactacagcttcatccacttgagtttccaggaattctttgagctatgtactatctc  
 ctggacgagggggaggggcggggcaggcccagaccagagcgtgaccaggtgttgaccgag  
 tacgcgttttctgaaaggagcttcttgccactcaccagccgcttctgttggactcctg  
 aacgaggagaccaggagccacctggagaagagtctctgctggaaggtctcgccgcacatc  
 aagatggacctgttgagtgatccaaagcaaagctcagagcgacggctccaccctgcag  
 cagggtccttggagttcttcagctgctgtacgagatccaggaggaggagtttatccag  
 caggccctgagccacttccaggtgatcgtggtcagcaacattgcctccaagatggagcac  
 atggtctcctcgttctgtctgaagcgtgcaggagcggcagggtgctgcacttgatggc  
 gccacctacagcgaggaggggaagaccgcgcgaggtgctccgagggagcgacacagctg  
 ttggtgagctcagaccagagaggaccttctgctggacgctacagtgaacatctggca  
 gcggccctgtgaccaatccaaacctgatagagctgtctctgtaccgaaatgccctgggc  
 agccgggggggtgaagctgctctgtcaaggactcagacaccccaactgcaaaacttcagaac  
 ctgaggtgaagaggtgcccagctctccagctcagcctgcgaggacctctctgcagctctc  
 atagccaataagaatttgacaaggatggatctcagtggaacggcggttgatttccaggc  
 atgatgctgctttgaggggctgcggcatccccagtgaggctgcagatgattcagttg  
 aggaagtgctcagctggagtcggggcttctcaggagatggcttctgtgctcggcaccac

Forts. Fig. 1

ccacatctggttgagttggacctgacaggaaatgcactggaggatttgggcctgaggtta  
 ctatgccagggactgaggcaccagctctgcagactacggacttctgtggctgaagatctgc  
 cgcctcactgctgctgctgtgacgagctggcctcaactctcagtgtaaccagagcctg  
 agagagctggacctgagcctgaatgagctgggggacctcggggtgctgctgctgtgag  
 ggctcaggcatcccacgtgcaagctccagacctgcgggttgggcatctgccggctgggc  
 tctgccgctgtgagggctcttctgtggtgctccaggccaaccacaacctccgggagctg  
 gacttgagtttcaacgacctgggagactggggcctgtggttgctggctgaggggctgcaa  
 catcccgcctgcagactccagaaactgtggctggatagctgtggcctcacagccaaggct  
 tgtgagaatctttacttcacctggggatcaaccagaccttgaccgacctttacctgacc  
 aacaacgccttaggggacacaggtgtccgactgctttgcaagcggtgagccatctggc  
 tgcaaacctccgagtcctctggttatttgggatggacctgaataaaatgaccacagttt  
 ccggagccattacagccagacgctgtaagggacctgtaccaagacagtttccggctggg  
 aatcgaaaccacaggtctcttagttcctgcagaagaccgagctccacggcatccgttgat  
 atgggcgtcaccggtgacgctcaaatgtcgcagcactttccacttgagcatcagaatagt  
 gctccacatttgaggccacaggccagctgcgggagtacgtgctcaacctttctggttaa

.....  
 >NALP4/PY6.hs

1.7

MADSSSSSFFPDFGLLLYLEELNKEELNTFKLFLKETMEPEHGLTPWNEVKARREDLANLMKKYYPGEKA  
 WSVSLKIFGKMNLDKLCERAKEEINWSAQITIGPDDAKAGETQEDQEAFLVIVNTGVPNSWATDPYWSAAPR  
 ESGRIAGGDGTEYRNRIKEKFCITWDKSLAGKPEDFHHGIAEKDRKLEHLFDVDVKTAQGPQIVVLQGA  
 AGVGKTTLVKAMLDWAEGSLYQQRFKYVFYLNREINQLKERSFAQLISKDWPSTEGPIEBIMYQPSLL  
 FIIDSFDELNFAFEEPEFALCEDWTQEHVPSFLMSSLLRKVMLPEASLLVTRLTTSKRLKQLLNHHYVE  
 LLGMSDAREEYIYQFFEDKRWAMKVFSSLSKNEMLFSMCQVPLVCWAACCTCLKQQMEKGGDVTLTCQTTT  
 ALFTCYISSLFTFPVDGGSPLPNQAQLRRLCQVAAKGIWMTYVFYRENLRRLGLTQSDVSSFMDNSNIIQK  
 DAHEYENCYVFTHLHVQEFFAAMFYMLKGSWEAGNPSQPFEDLKSLLQSTSYPKDPHLTQMKCFLGLLNED  
 RVKQLERTFNCKMSLKI KSKLLQCEVLGNSDYSQSLGFLELFHCLYETQDKAFISQAMRCFPKVAINIC  
 EKIHLVSSFLKHCRCRLRTIRLSVTVVFEKKILKTSLPNTWEWMNGRAIGQIRPLECFEEDFLVDCAH  
 GGAALDALAFPKYTYFYSNTIL

>NALP4/Py6.dna

ATGGCAGATTTCATCATCATCTTCTTTCTTCCTGATTTTGGGCTGCTATTGTATTGAGGAGCTAAACAA  
 AGAGGAATTAATACATTCAAGTTATTCTAAAGGAGACCATGGAACCTGAGCATGGCCTGACACCCTGGA  
 ATGAAGTGAAGAAGGCCAGGCGGAGGACCTGGCCAATTGATGAAGAAATATTATCCAGGAGAGAAAGCC  
 TGGAGTGTGTCTCTCAAAATCTTTGGCAAGATGAACCTGAAGGATCTGTGTGAGAGAGCGAAAGAAGAGAT  
 CAACCTGGTCCGCCAGACTATAGGACCAGATGATGCCAAGGCTGGAGAGACACAAGAAGATCAGGAGGCGAG  
 TGCTGGTTCATAGTTAACACAGGGGTCCCAACTCCTGGGCCACAGACCCTACTGGTCCGCGGCCCTCCG  
 GAATCAGGTCCGATAGCAGGAGGTGATGGAACAGAATACAGAAATAGAATAAAGGAAAAATTTTGCATCAC  
 TTGGGACAAGAAGTCTTTGGCTGGAAAGCCTGAAGATTTCCATCATGGAATTGCAGAGAAAGATAGAAAAC  
 TGTGGAACACTTGTTCGATGTGGATGTCAAACCGGTGCACAGCCACAGATCGTGGTGTCTCAGGGAGCT  
 GCTGGAGTTGGGAAAAACAACCTTGGTGAGAAAGGCAATGTTAGATTGGGCAGAGGGCACTCTCTACCAGCA  
 GAGGTTTAAGTATGTTTTTTATCTCAATGGGAGAGAAATTAACCAGCTGAAAGAGAGAGAGCTTTGCTCAAT  
 TGATATCAAAGGACTGGCCAGCACAGAAGGCCCATTAAGAAATCATGTACCAGCCAAGTAGCCTCTTG  
 TTTATTATTGACAGTTTCGATGAACCTGAACCTTGCCTTTGAAGAACCTGAGTTTGCAGTGTGCGAAGACTG  
 GACCCAAGAACAACCCAGTGTCTTCTCATGAGTAGTTTGTGAGGAAAGTGATGCTCCCTGAGGCATCCT  
 TATTGGTGACAACAAGACTCACAACCTCTAAGAGACTAAAGCAGTTGTTGAAGAATCAACCATTATGTAGAG  
 CTACTAGGAATGTCTGAGGATGCAAGAGAGGAGTATATTACCAGTTTTTTGAAGATAAGAGGTGGGCCAT  
 GAAAGTATTCAAGTTCACTAAAGCAATGAGATGCTGTTAGCATGTGCCAAGTCCCCCTAGTGTGCTGGG  
 CCGCTTGTACTTGTCTGAAGCAGCAATGGAGAAGGGTGGTGTGTCACATTGACCTGCCAAACAACCA  
 GCTCTGTTTACCTGCTATATTCTAGCTTGTTCACACCAGTAGATGGAGGCTCTCCTAGTCTACCCAACCA  
 AGCCAGCTGAGAAGACTGTGCCAAGTGCCTGCCAAAGGAATATGGACTATGACTTACGTGTTTTACAGAG  
 AAAATCTCAGAAGGCTTGGGTAACTCAATCTGATGTCTCTAGTTTTATGGACAGCAATATTATTACAGAAG  
 GACGCAGAGTATGAAAACCTGCTATGTGTTACCCACCTTCATGTTGAGGAGTTTTTGCAGCTATGTTCTA  
 TATGTTGAAAGGCAGTTGGGAAGCTGGGAACCCCTTCTGCCAGCCTTTTGAAGATTTGAAGTCATTACTTC  
 AAAGCACAAGTTATAAAGACCCCATTTGACACAGATGAAGTGCTTTTTGTTTTGGCCTTTTGAATGAAGAT  
 CGAGTAAACAACCTGGAGAGGACTTTTAACTGTAAATGTCACTGAAGATAAAATCAAAGTTACTTCAGTG



Forts. Fig. 1

tttttccccatatgggacattacgacttggcctggaaaccagagggacttcttctaccaa  
 ggtgtacacaggcacgaggagtacttaccatgtctgtcttctgccccaaagacccaggggt  
 agacagcccaagaccgtggccatacagggagctcctgggatcggaaaaaacaatcctggcc  
 aaaaagggtgatgtttgagtgggcccagaaacaagtctacgccccacaagcgctgggtgtgt  
 tttacttccattgccaagaggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt  
 gagcaaaagtggcctggatctcaggacctcgtgtcaaagattatgtccaaacccgaccaa  
 ctctctgtctcttggatggctttgaggagctcacatctaccctcattgacagactggag  
 gacctgagtgaaactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagtttgctg  
 agcaaaacgatgcttccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag  
 acatgcaagcccttgttgaaatgtcctctctcgtaacccttccgggggtttaatacgtg  
 gaaaaaatcaagtatttccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg  
 agtttcgccatggaaaaacaccattctcttctccatgtgcccgggtccctgtgggttgcctg  
 atggctctgtcttggcttgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcagtg  
 ccaaatgccacctctgtgttctgtcgggtatatttctagcttggttccaccagagctgag  
 aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac  
 agcatgtggccacaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaaagccaagctggat  
 cagacggggagtcaaccgcttcccttggcatgagttatcttccggagaattgacaggtgaggaa  
 gaccactatgtcttaccctcgtgacttttcaggaatttttgcggccttggttttatgtt  
 ctctgttttccacaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc  
 ctgatagcagagtcacagaggaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttattc  
 gggttttctgaacgaggcctgcgcttccggcgtggaacagtcattccaatgcaaggtgtct  
 ttcggtaataagaggaaactgctgaaagtcatacctctgttgcatataatgtgaccacct  
 tctccgggagtggggtcccgagttatttctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc  
 tttgtaaagccaagccctaataatgattatcataaagtgtcttgagaattggcaacaacaaa  
 gaagtccaagtgtctgcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg  
 accgtcaccttgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggctct  
 gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgttgaaccaggacttaatcgggtgttttgacgggg  
 aaccagcatctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtggagtcacaaagctgtgaag  
 ctctctatgacgggtgtgtgagatcccccggtgcccgtctgcagtgctcaggttggagac  
 tgcttggccacccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat  
 ctaaagactctcactactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcggtattacctgtct  
 gtggcccagctggagaggctgtgcagagtaagatgtgacccacctgagcttggcagaa  
 aacgccttgaaagatgaaggggccaagcatatttggaaatgccttgcacacctgagatgt  
 cctctgcagaggctgggtactgagaaagtgtgacttgaccttaattgctgtcaggtatg  
 atctctgcgctctgtaaaaataaaacccctgaaaagtcttgacctaaagttttaatagcctg  
 aaggatgtatggggtgtatcctgtgtgtgaggccctgaagaacctgactgtacattacag  
 atcctggagctggaaaaactgcctgttccacctccatctgctgccaggccatggcttccatg  
 ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcatgagggtctat  
 ggtattctgacctgtgtcgaggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcattttc  
 actattcacaaatagccaagatttgggaagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata  
 aagaaaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
 tgtagaacaatggtatcatagaacacgacactgggtgtcaggtcctacttgcctctata  
 ttaccaagaatccacttttcccccaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
 ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac  
 aaggaaagaatttcagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca  
 tgctctattccacagtttgaatcgagaatgccaacgtggaatgtctggcactcctcttg  
 catgagtattatggagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaaatg  
 aacctgcgaacctctcggaagaagcagggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
 cctgaagcaacgatgactgaccaaggaagcaaggaaggaaggtgccaggaatttcacaa  
 gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaatttcacaagct  
 atggaaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaatttcacaagctatg  
 gaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaatttcacaagctatg  
 gactacaagatcagctgatgacaaattcgctgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt  
 gaaaaactgctgctgactggcggaaatgcaaacgttggctgggtgcttttgattcagac  
 cgggtggggcttccggcctcgacgggtggtctgtcagcgaaagtccaggaattgggaaatcg  
 gctctagccagaaggtcgctgtgtgtgtggcgcaaggtggactctaccaggggaatgttc  
 tctacgtcttcttcttccctcccggttagagagatgcagcggaagaaggagagcaggtgcaca  
 gagtcatctccaggagtgccagactccaggctccggtgacggagatcatgtcccgaa

Forts. Fig. 1

ccagaaaggctgttgttcatcattgacggtttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
gacacaaagctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcacctcatacgcagt  
ctgctgaggaaggctcctgctccctgagtccttctctgatcgctaccgctcagagacgtgggc  
acagagaagctcaagtcagaggtcggtctctcccggttacctgttagttagaggaatctcc  
ggggaacaaagaatccacttgctccttgagcggggttggtgagcatcagaagacacaa  
gggttgctgcatcatgaacaaccgtgagctgctcgaccagtgccagggtgcccgctg  
ggctctctcatctgctggcctgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc  
ttcaaccaaaccgtcacaggcctgcacgcccgttttgtgttcatcagctcacccctcga  
ggcgtggtccggcgctgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgttctgcccgt  
atggctgtggaggagtggtgaataggagtcagtggttgacggtgacgacctatgggt  
caaggactcggggagctgagctcctgctctgtttcacatgaacatccttctccagac  
agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagctctccaggacttctgtgcgc  
ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgccctctgtacgttgag  
aagacaaagaggtccatggagcttaaacaggcaggcttccatataccactcgtttggatg  
aagcgttcttgtttggcctcgtagcgaagacgttaaggaggccactggaggctcctgctg  
ggctgtcccgcttccctgggggtgaagcagaagcttctgactgggtctctctgttgggt  
cagcagcctaatagccaccacccaggagacacctggacgcttccactgtcttctcgag  
actcaagacaaagagtttgttcgcttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg  
attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgacctccagcactgtccgtatttg  
cggaaaaatccgggtggatgtcaaagggtcttcccaagagatgagtcgctgaggcatgt  
cctgtggctccctctatggatgcgggataagacctcattgaggagcagtgaggaaagtctt  
tgctccatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
acagagcggggccatgaagacctgtgtgccaagctgaggcatccacctgcaagatacag  
acctgatgtttagaatgcacagattaccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgtc  
atggccaaccgtaacctaaagtccctcaacttgggaggcaccacctgaaggaaaggat  
gtaaggatggcggtgtgaagccttaaaacacccaaaatgttgttggagtcttggaggctg  
gattgtgtggatgacctatgcctgttacctgaagatctcccaatccttacgacctcc  
cccagcctgaaatctctgagcctggcaggaaacaagggtgacagaccagggaagtaatgcct  
ctcagtgatgccttgagagctctccagtgccgctgcagaagctgatactggaggactgt  
ggcatcacagccacgggttgccagagcttgccctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
acacacctgtgcttatccaacaacagcctggggaaacgaagggtgtaaatctactgtgtcga  
tccatgaggcttccccactgtagtctgcagaggctgatgctgaatcagtgccacctggac  
acggctggctgtggttttcttgcacttgcgcttatgggtaactcatggctgacgcacctg  
agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgcgaggctcatgaga  
gaacctatctgtcatctccaggacctggagtggtaaaagtgtcatctcacggccgctgc  
tgtgagagctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg  
gacaatgcctgggtgacgggtggggttgctgactgtgcgagggaactgaagcaaaagAAC  
agtgttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgattgtgtgaggca  
ctctccttggcccttctctgcaaccggcatctgaccagcttaaacctgggtgcagaataac  
ttcagtcaccaaggaatgatgaagctgtgttcggccttgcctgtcccacgtctaactta  
cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtagtt  
ttgcttaaagtcactgtttccaagaacctatcaatgacattaaaggagaacttactgtac  
ctcccaaacctataaacacgacccggcacagagactctgaggaaggaaatcatggatgg  
actgaaaggctgtggaaatggcagctaccctgtgcaataaggaagctgctggagggaagt  
cagctactcaagccccgagtcgtaattgacggtagttggcattcttttgatgaagatgac  
cgattggatcttcaaagccagcaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
gcatcacagaagtcatatccatcaaccctgccacattccgtttggatagaagcactgct  
gacgggtgggaccggccacttccacatcgggggtcccgctgtgggtgttaggggtgttcagt  
gacgtccctgcttttacctgccaggtaagagatgaagtaggtatcctgttcacaacagc  
caaaagggtgcagacaaccacgtgtctatcagcagatga

1.9 &gt;NALP6/PY9

MDQPEAPCSSTGPR LAVARELLLALEELSQEQLKFRHKL RDVGP DGRSI PWGR LERADAVDLAEQLAQF  
YGP E PALE VARKTLK RADARDVAAQLQERR LQRLGLSGS GTLLSVSEYKKKYREHVLQLHARVKERNARSVK



Forts. Fig. 1

GAAGTACCCTTTTCGACCACCCTGCTGTGACATCTGCCCCACACCTCCACCAGACCCTCGGCTCCTCCAGGG  
 CAAGGCTTTTGCCAGAGTTCCTTTGAATATAGCTCCAATTACAGCCCCTGCCAGGGGCTTGGCATCTGTTG  
 AGAGGATGAATGTACGGTGTGGCAGGGGCTGGGCTGGGGACCCAAAGACCCATGCAATGACTGACCCA  
 CTGTGCCATCTGAGCAGCCTCACGCTGTCCACTGCAAACTCCCTGACGCGGTCTGCCGAGACCTTTCTGA  
 GGCCCTGAGGGCAGCCCCCGCACTGACGGAGCTGGGCTCCTCCACAACAGGCTCAGTGAGGCAGGACTGC  
 GTATGCTGAGTGAGGGCTAGCCTGGCCGAGTGACGGGTGCAGACGGTCAGGGTACAGCTGCCTGACCCC  
 CAGCGAGGGCTCCAGTACCTGGTGGGTATGCTTCGGCAGAGCCCTGCCCTGACCACCCTGGATCTCAGCGG  
 CTGCCAACTGCCCCCCCCATGGTGACCTACCTGTGTGAGTCTGACGACCCAGGGATGCGGCCTGCAGA  
 CCCTCAGCCTCTCGCTTCTTCTGACCCGACCCCGAGTTCTTCTCCGGACGGTGTGAGAAACCCGGGCGC  
 CGGCTGGGGCTGGAGTCTCGCTGGCCTCGGAGCGCCCCGAGCCCTCGGGCGACAGCGAGGCGAGGCCCA  
 GGTGGAGGCGGCCGGGGCGGGGCGGGGAGGAGCGCGGAGGGAACCCCGCCGCGGGCCCCACCC  
 CACAGCCGCCCCGGGACGACGCTCGGGTCCAGGCTCGAGCTTTGCTCACTCAGGGCGCTTCGTGCAGGGA  
 ACGCCAGGCCCCCGGACGCGACCCACGCGGCGCTGCCAGCGGGGACCGAGGGGAGCCGGGGCCGCGGCCG  
 CGAGTCCACGTCCCGCCCCCGGGCCCCGCGCCAGCGACCGCCCCCGCCGCCAGGGAACCGCCCCGCTCCC  
 AGCGACCGCCCCGGGCCCTCGGGGCGGGACCGCGACCTTCTTGGTGGCGCGGACCGGGCGGCTCCTCC  
 TTCTTCCCGCCCCTGGCGTGAGCAGAGGGAACACAGGTTCCACAGCTGGCGCCCGCGACCGGGTGGGGCT  
 GCGGCCGCTCAGGCCCAGCAGCTCCATGGAGGACCGCGGCGAGGACCCACACGTTTGTGCCCCACTCTC  
 TGCCCCAGTGACCCCCCTCTCTTGGCCACTGTGACCAACGCATACCTGGGCACACGAGTGTTCACGACACG  
 CTGCACGTGAGCGGCGTGTAATGGGGCTGGCGGGGACACGCACCGGGCCATGCTGCCAGCCCCCTCAA  
 CGTCCGCTGGAGGCCCTTGACGGATGGGGGAGCAGCTGACCGAGACCTTCGCCCTGGACCAACACAG  
 GCTCCTTTCTTACACCCCTGGAGGGCCCCCGCTTCCGGGCCCTCCCACTGCACTCTATGCGCATCGCACGCTG  
 CCCCACGTGCTGGCTTTCGAGTGTCCATCGCCCCCTGGCCCCGGGGAGCGGGCCCATCAGCTGCTCCT  
 GCGGTGAGCCTTCTCCCCAGAAAGCCAGACCTGGACCTGCATCAGGGTCTGACTTCCAGGGAGCCCGGT  
 ACCTGTATGGCCACACCCTCACCCCTGAGCAGCCCGGGGGGCCACAGCAAGAGGTACACATGCTGTGGACA  
 CCAGCACCCCCAGACCTGACCCCTTGGGGAAGGTGAGGAGGCTAGGACGTGGGACTTCTGACAGCAGTGGG  
 CGGCAGCCAGGCTGAGGCTCAGGCTTGCCTCACTGAGGCCCTGCAGCTGCAGGCCAGGGGAGCTCTGTATA  
 CGGCTCACGCACAGGCTGGGCCAGCTCTGGGTAGAATGTGGCTTGGACGTGGTGGGGCCCCCTGCAGCTG  
 CGCCAGGCCCTGCGTGGCTCCCTCTACTACCTGCTCAGTGCCCTGCCCCAGCCCAAGGCCCCAGGATACAT  
 CTGCCATGGCCTCAGTCTTGGGGGCTCTCCAATGGGAGCCGTGAGGAATGCTACTGGGGCCACGTCTTCT  
 TGGACCAGGACCTCTGGATGTTCCGAGTATCTGATGTTCCACCCAGAAGCCCGCCAGGGCCATCTGGAG  
 TACCGCATCCGCACGCTGGACGGGGCCCTGGAGAAGCCCGAAGCTGGGCTACACGGGAGCCAAAGTTTGC  
 CTGGGAGAGTGACAGCTCCGGCTTAGAGGTTTGCCCTGAGGACATTTACGGAGTCCAGGAGGTCCACGTCA  
 ACGGGCGCGTGGTGTGGCCTTCGAGCTGTACTACCATAACACCCAGGACCTGCAGCTATTCGAGAGGCT  
 GGTGGCTGGGACGTGGTCAAGGCTGTGGCCGAGTTTGGTGCAGTCTGTGTTGAGTGGAGCCCCAGGGAGGA  
 AAAGTACCACCTGAGGGGAGTCATGTCCCCCGACGAGTACCATTCAGGGGTCAACAACCTGTGTACACCA  
 ACGTCTGGTCCAGAACAGCCTGCGCTTTGCTGCTGCCCTGGCCAGGACCTGGGTCTTCCCATCCCCAGC  
 CAGTGGCTGGCGGTGGCTGACAAGATCAAGGTACCCTTTGACGTGGAGCAGAACTTCCACCCGAGTTCGA  
 TGGGTATGAGCCTGACCCTCGAGTCTGTCTTGAACACCTTCCAGTCAGCGGCACCTCCCTGTAGGAGAGG  
 TGGTGAAGCAGGCAGACGTCTGCTCCTGGGATACCCAGTCCCCTTCTCCCTGAGTCTGATGTTGCGAGG  
 AAAATCTGGAGATTTACGAGGCTGTGACGTCCCCCGAGGGCCCCCGCATGACCTGGAGCATGTTTGCTGT  
 GGGCTGGATGGAGCTGAAGGACGAGTGCGGGCCCCGGGCTCCTGGACAGGAGCTTTGCCAACATGGCTG  
 AACCTTCAAGGTGTGGACGGAGAATGCAGACGGGTGAGGCTGTGAACCTTCTGACAGGCATGGGGGGC  
 TTCTGACAGGCGGTGGTCTTCCGGTGCACGGGTTTCAAGGTACCCGAGCGGGTGTGACCTTTGACCCTGT  
 GTGTCTGTGCGGGATCTCCAGAGTGAGCGTCTCCGGCATCTTCTACAGGGGAACAAGCTCAACTTCTCTT  
 TTCCGAGGACTCCGTGACCGTGGAGGTACAGCTCGAGCAGGGCCCTGGGCTCCTCACCTGGAGGCTGAG  
 CTGTGGCCATCCAGTCCCGGCTCTCCCTGTTGCCAGGACACAAGGTCTCCTTTCCCGCTCGGCTGGCCG  
 GATACAAATGTACCCCCGAAGCTGCCTGGAAGTTCAGCTCCGAGTTCCTGGGAGGACTTTTTAGATG  
 TTAGGGACCCGCTCCAGAGCCCCCTCTGGGTACCCCTGGGTTCCTCCAGCCCCACCGAGTCACTCACTGTG  
 GACCCTGCCTCTGAATAA

1.10 >PY10  
 MASSAELDFNLQALLEQLSQDELKFKSLIRTISLGKELQTPQTEVDKANGKQLVEIFTSHSCSYWAGMA  
 AIQVFEKMNRTLHSGRADEHCVMPPP  
 >PY10.dna

Forks. Fig. 1

ATGGCATCTTCTGCAGAGCTGGACTTCAACCTGCAGGCTCTTCTGGAGCAGCTCAGCCAGGATGAGTTGAG  
 CAAGTTCAAGTCTCTGATCAGAACAATCTCCCTGGGAAAGGAGCTACAGACCGTCCCCCAGACAGAGGTAG  
 ACAAGGCTAATGGGAAGCAACTGGTAGAAATCTTCACCAGCCACTCCTGCAGCTACTGGGCAGGGATGGCA  
 GCCATCCAGGCTTTGAAAAGATGAATCGAACGCATCTGTCTGGGAGAGCTGATGAACACTGTGTGATGCC  
 CCCACCTTAA

\*\*\*\*\*  
 >NALP7/Py11

1.11

FFSLNLRSH TSTMTSPQLE WTLQTLLEQL NEDELKSFKS LLWAFPLEDV LQKTPWSEVE  
 EADGKKLA EI LVNTSSENWI RNATVNILEE MNLTELCKMA KAEMMEDGQV QEIDNPGLD  
 AEEDSELAKP GEKEGWRNSM EKQSLVWKNT FWQGDIDNFH DDVTLRNQRF IPFLNPRTPR  
 KLTPYTVVLH GPAGVGKTTL AKKMLDWDN CNLSPTLRYA FYLSCKELSR MGPCSFaeli  
 SKDWPELQDD IPSILAAQQR ILFVVDGLDE LKVPPGALIQ DICGDWEKKK PVPVLGSLI  
 KRKMLPRAAL LVTRPRALR DLQLLAQQPI YIRVEGFLEE DRRAYFLRHF GDEDQAMRAF  
 ELMRSNAALF QLGSAPAVCW IVCTTLKLQM EKGEDPVPTC LTRTGLFLRF LCSRFPQGAQ  
 LRGAIRTLISL LAAQGLWAQM SVFHREDLER LGVQESDLRL FLDGDILRQD RVSKGCYSFI  
 HLSFQQFLTA LFYALEKEEE EDRDGHAWDI GDVQKLSSGE ERLKNPDLIQ VGHFLFLGLAN  
 EKRAKELEAT FGCRMSPDIK QELLQCKAHL HANKPLSVTD LKEVLGCLYE SQEEELAKVV  
 VAPFKEISIH LTNTSEVMHC SPSLKHQCDL QKLSLQVAKG VFLENYMDFE LDIEFESSNS  
 NLKFLEVKQS FLSDSSVRIL CDHVTRSTCH LQKVEIKNVT PDTAYRDFCL AFIGKTLTH  
 LTLAGHIEWE RTMMLMLCDL LRNHKCNLQY LRLGGHCATP EQWAEFFYVL KANQSLKHLR  
 LSAVLLDEG AMLLYKTMTR PKHFLQMLSL ENCRLTEASC KDAAVLVVS KKLTHLCLAK  
 NPIGDTGVKF LCEGLSYPDC KLQTLVLQOC SITKLGCYRL SEALQEACSL TNLDLSINQI  
 ARGWLILCQA LENPNCNLKH LRLWSCSLMP FYCQHLGSAL LSNQKLETLG LGQNLHWKSG  
 IIKLFGVLRQ RTGSLKILRL KTYETNLEIK KLEEVKEKN PKLTIDCNAS GATAPPCCDF  
 FC

>NALP7/Py11.cdna

ttcttcagccttaacctaaggtctcactactcgagcactatgacatcgccccagctagag  
 tggactctgcagacccttctggagcagctgaacgaggatgaattaaagagtttcaaattcc  
 cttttatgggcttttccccctcgaagacgtgtacagaagacccccatggtctgaggtggaa  
 gaggtgatggcaagaaactggcagaaattctgggtcaacacctctcagaaaatttgata  
 aggaatgagcagtgtaacatcttgaagagatgaattctcacggaattgtgtaagatggca  
 aaggctgagatgatggaggacggacaggtgcaagaaatagataatcctgagctgggagat  
 gcagaagaagactcggaggttagcaagccaggtgaaaaggaaggatggagaaattcaatg  
 gagaacaatcttgggtctggaagaacaccttttggcaaggagacattgacaatttccat  
 gacgagctcactctgagaaaccaacgggttcattccattcttgaatcccagaacaccagg  
 aagctaacaccttacacgggtggtgctgcacggccccgcaggcgtggggaaaaccacgctg  
 gccaaaagtgtatgctggactggacagactgcaacctcagccccagcgtcagatacgcg  
 ttctacctcagctgcaaggagctcagccgcatggggccccctgcagttttgcagagctgatc  
 tccaaagactggcctgaattgcaggatgacattccaagcatcctagcccaagcacagaga  
 atcctgttctggtcgatggccttgatgagctgaaagtcccacctggggcgctgatccag  
 gacatctgcggggactgggagaagaagaagccgggtgcccgctcctcctggggagttgtctg  
 aagaggaagatgttaccagggcagccttgctgggtcaccacggggccagggcactgagg  
 gacctccagctcctggcgagcagccgatctacataagggtggagggttccctggaggag  
 gacaggaggccctatttcttgagacactttggagacgaggaccaagccatgcgtgccttt  
 gagctaataaggagcaacgcggcctgttccagctgggtcggcccccggggtgtgctgg  
 attgtgtgcagactctgaagctgcagatggagaaggggaggaccgggtccccacctgc  
 ctccccgcacggggctgttctcgtgttctctctgcagccggttccccgcagggcgacag  
 ctgcggggcgcgctgcggacgtgagcctcctggccgcgaggccctgtggggcgagatg  
 tccgtgttccaccgagaggacctggaaaggctcgggggtgcaggagtcggacctcctctg  
 ttcttgagcggagacatcctccgcccaggacagagcttccaaaggctgctactccttcac  
 cactcagcttccagcagtttctcactgccctgttctacgccctggagaaggaggaggag  
 gaggacagggacggccacgcctgggacattggggacgtacagaagctgctttccggagaa  
 gaaagactcaagaacccccgacctgattcaagtaggacacttcttattcggcctcgtaac  
 gagaagagagccaaggagttggaggccacttttggtgctcggatgtcaccggacatcaaa  
 caggaattgctgcaatgcaagcacatcttcatgcaataagcccttatccgtgaccgac  
 ctgaaggaggtcttgggctgctgtatgagctcaggaggaggagctggcgaagggtggtg  
 gtggccccgttcaaggaaatttctattcacctgacaaataacttctgaagtgtgcatgtg  
 tccttcagcctgaagcattgtcaagacttgcaaaactctcactgcaggtagcaaaagggg  
 gtgttctggagaattacatggattttgaactggacattgaatttgaaagctcaaacagc

Forts. Fig. 1

aacctcaagtttctggaagtgaacaaagcttctgagtgactcttctgtgaggattctt  
 tgtgaccacgtaacccgtagcacctgtcatctgcagaaagtggagattaaaaacgtcacc  
 cctgacaccgctaccgggacttctgtcttctgttctcattgggaagaagacctcacgcac  
 ctgaccttggcagggcacatcgagtgggaacgcacgatgatgctgatgctgtgtgacctg  
 ctgagaaatcataaatgcaacctgcagtagctgaggttgggaggtcactgtgcccaccg  
 gagcagtgaggctgaattcttctatgtcctcaaagccaaccagtcctgaagcacctgcgt  
 ctctcagccaatgtgctcctggatgaggtgcccattgttctgtgtacaagaccatgacacgc  
 ccaaaacacttctgtcagatgttgtcgttggaaaactgtcgtcttacagaagccagttgc  
 aaggaccttctgtcttctgttctgtcagcaagaagctgacacacctgtgcttggccaag  
 aacccatttggggatacaggggtgaagtttctgtgtgagggcttgagttacctgatattg  
 aaactgcagaccttgggtgttacagcaatgcagcataaccaagcttggctgtagatatctc  
 tcagaggcgctccaagaagcctgcagcctcacaaacctggacttgagtatcaaccagata  
 gctcgtggatttggattctctgtcagcattagagaatccaactgtaacctaaaacac  
 ctacgcctctggagctgtcctctcatgccttcttattgtcagcatcttggatctgtctc  
 ctgagcaatcagaagcttgaacctctggacctgggcccagaatcatttgtggaagagtggc  
 ataattaagctcttgggggttctaagacaaagaactggatccttgaagatactcaggttg  
 aagacctatgaaactaatttggaaatcaagaagctgttggaggagtgaaagaaaagaat  
 cccaagctgactattgattgcaatgcttccggggcaacggcacctccgtgtgtgacttt  
 ttttgcgtga

## 1.12 &gt;NALP8/Py12

MSDVNPPSDT PIPFSSSTH SSHILPWTF S CYPGSPCENG VMLYMRNVSH EELQRFKQLL  
 LTELSTGTMP ITWDQVETAS WAEVVHLLIE RFPGRRAWDV TSNI FAIMNC DKMCVLVRRE  
 INAILPTLEP EDLNVGETQV NLEEGESGKI RRYKSNVMEK FFPIWDITW PGNQRDFFYQ  
 GVHRHEEYLP CLLLPKRPOG RQPKTVAIQG APGIGKTLA KVMFEWARN KFYAHKRWCA  
 FYFHCQEVNQ TTDQSFSELI EQKWPGSQDL VSKIMSKPDQ LLLLLDGFEELTSTLIDRLE  
 DLSEDWRQKL PGSVLLSSLL SKTMLPEATL LIMIRFTSWQ TCKPLLKCP S LVTLPGFNTM  
 EKIKYFQMYF GHTEEGDQVL SFAMENTILF SMC RVPVVCW MVC SGLKQOM ERGNLQTQSC  
 PNATSVFVRY ISSLPFTRAE NFSRKIHQAQ LEGLCHLAD SMWHRKWVLG KEDLEAKLD  
 QTGVTAF LGM SILRRIAGEE DHYVFTLVTF QEFFAALFYV LCFPQRLKNF HVL SHVNIQR  
 LIASPRGSKS YLSHMLFLF GFLNEACASA VEQSFQCKVS FGNKRKLLKV IPLLHKCDPP  
 SPGSGVPQLF YCLHEIREEA FVSQALNDYH KVVLRIGNNK EVQVSFACLK RCQYLHEVEL  
 VTILNFMNVW KLSSSSHPGS E

## &gt;NALP8/Py12---Py8.dna

gaaaaaatcaagtatctccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg  
 agtttcgcatggaacacaccattctcttctccatgtgcccgggtccctgtgggttgctgg  
 atggtctgctctggtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcattg  
 ccaaatgccacctctgtgttctgctcgggtatatttctagcttgtttcccaccagagctgag  
 aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac  
 agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggtaagaagatcttgaggaagccaagctggat  
 cagacgggagtcaccgccttcttggcatgagtatttctcggagaattgcaggtgaggaa  
 gaccactatgtctttaccctctgacttttcaggaatttttgcggccttgttttatgtt  
 ctctgtttcccaaaagactcaaaaatttctcatgtgttgaccacgtgaatatccagcgc  
 ctgatagcgagtcacagaggaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttattc  
 ggttttctgaacgaggcctgcgttctcgccgtggaacagtcattccaatgcaaggtgtct  
 ttcggtaataagaggaaactgtgaaagtcataacctgttgcataaatgtgaccacct  
 tctccgggagtgagggtcccgcagttattctactgtctgcatgaaatccgggagggaagcc  
 tttgtaagccaagccctaaatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaaa  
 gaagtccaagtgtctgcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcattgaggtggaactg  
 accgtcacctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccattctggtct  
 gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgttgaaacaggacttaacgggtgttttgacgggg  
 aaccagcatctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtggagttccaaagctgtgaag  
 ctctatgcagggtgctgagatcccccggtgcccgtctgcagtgctcaggttgggaagac  
 tgettggccacccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat  
 ctaaagactctcatactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgattacctgtct  
 gtggccagctggagaggctgtcgagagtaagatgctgaccacctgagcttggcagaa

Forks. Fig. 1

aacgccttgaagatgaagggccaagcatatttggatgccctgccacacctgagatgt  
 cctctgcagaggtcgtgactgagaaagtgtgacttgacctttaattgctgtcaggatatg  
 atctctgcgctctgtaaaaataaaacctgaaaagtcttgacctaaagtttaatagcctg  
 aaggatgatggggtgatcctgctgtgtgaggccctgaagaacctgactgtacattacag  
 atcctggagctggaaaactgcctgttcacctccatctgctgccaggccatggcttccatg  
 ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagcttat  
 ggtattctgaccttgtgagggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcatttct  
 actattcacatagccaagatttggagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata  
 aagaaaatgtgggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
 tgtagaaaacaatgggtatcatagaaacagcacactggtgtcaggtcctacttgctctata  
 ttaccaagaatccacttttcccccaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
 ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac  
 aaggaaatattcagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca  
 tgctctattccacagtttgaatcgagaatgccaacgtggaatgtctggcactcctcttg  
 catgagtattatggagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg  
 aacctgcgaacctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
 cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgccaggaatttcacaa  
 gctgtgcaacaagatagtccacagctgcagagacaaaagaacaagaatttcacaagct  
 atggaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggaggtgacacatgg  
 gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgctgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt  
 gaaaacactgctgctgactggcggaaatgcaaacgttggctgggtgtctttgattcagac  
 cgggtgggcttccggcctcgacgggtgttctgcacggaaagtccaggaattgggaaatcg  
 gctctagccagaaggatcggtgtgtgtgtggcgcaagggtggactctaccagggaaatgttc  
 tctacgtcttcttctccccggttagagagatgcagcggaaagaaggagagcagtgctcaca  
 gaggttcatctccaggagtggtccagactcccggtgacggagatcatgtcccga  
 ccagaaaggctgtgttcatcattgacgggttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
 gacacaaagctctgcaagactgggctgagaagcagcctccgttcacctcatacgcagt  
 ctgctgaggaaggtcctgctccctgagtccttccctgagtcgtcaccgtcagagacgtgggc  
 acagagaagctcaagtcagaggtcgtgtctccccgttacctgttagttagaggaatctcc  
 ggggaacaaagaatccacttgctccttgagcgcgggattggtgagcatcagaagacacaa  
 ggggtgcgtgcgatcatgaacaacctgagctgtctgaccagtgccaggtgcccgccgtg  
 ggctctctcatctgctggcctgcagctgcaggacgtggtgggggagagcgtcgcccc  
 ttcaaccaaagcgtcacaggcctgcagcgcgttttggtttcatcagctcacccctcga  
 ggcgtggctccggcgtgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgtctctgcccgt  
 atggctgtggaggagtggtgaataggaagtcagtggttgacggtgacgacctcatgggt  
 caaggactcggggagtgtagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctcccagac  
 agccactgtgaggagtagtacaccttcttcacctcagctctccaggacttctgtgcccgc  
 ttgtactacgtgttagaggcctggaaatcgagccagctctctgcccctctgtacgttgag  
 aagacaagaggtccatggagcttaaacaggcaggcttccatatccactcgcttggatg  
 aagcgtttctgtgttggcctcgtgagcgaagacgtaaggaggccactggaggtcctgctg  
 ggctgtcccgttcccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt  
 cagcagcctaatagccaccacccaggagacacctggagccttccactgtcttttcgag  
 actcaagacaaaagagttgttgccttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg  
 attaacagaacctggacttgatagcatcttcttctgctccagcactgtccgtatttg  
 cggaaaattcgggtggatgtcaaaggatcttcccaagagatgagtcgctgaggcatgt  
 cctgtggctcctctatggatgcgggataagacctcattgaggagcagtgaggaaatctt  
 tgctccatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
 acagagcgggcatgaagacctgtgtgccaagctgaggcatcccactgcaagatacag  
 acctgatgtttagaaatgcacagattacccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgtc  
 atggccaaccgtaacctaaatccctcaacttgggaggcaccacctgaaggaaaggagat  
 gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagtctttgaggctg  
 gattgtgtggatgacccatgctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc  
 cccagctgaaatctctgagcctggcaggaaacaaggtgacagaccaggagtaatgcct  
 ctacgtgatgccttgagagctccagtgccctgcagaagctgatactggaggactgt  
 ggcacacagccacgggttgcagagctgtgacctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
 acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga  
 tccatgaggcttccccactgtagtctgcagaggctgatgtgaatcagtgccacctggac

Forts. Fig. 1

acggctggetgtggttttcttgacttgcgcttatgggtaactcatggctgacgcacctg  
 agccttagcatgaaccctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgcagggtcatgaga  
 gaaccatcttgtcatctccaggacctggagtggtaaagtgtcatctcaccgccgctgc  
 tgtgagagctctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg  
 gacaatgccctgggtgacgggtgggttgtgtgactgtgcgagggactgaagcaaaagaac  
 agtgttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgatgtgtgaggca  
 ctctccttggccctttcctgcaaccggcatctgaccagctctaaacctgggtgcagaataac  
 ttacgtcccaaaggaatgatgaagctgtgttcggcctttgctgtcccacgtctaactta  
 cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtagtt  
 ttgcttaaagtcactgtttccaagaacctatcaatgacattaagggaagacttactgtac  
 ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaaatcatggatgg  
 actgaaaggctgtggaatggcagtagcctgtgcaataaggaagctgctggaggaagt  
 cagctactcaagccccgagctgtaattgacggtagttggcattctttgatgaagatgac  
 cgattggatcttcaaagccagcaaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
 gcatacagaagtgcagatcccatcaacctgcccacattccgtttggatagaagcactgct  
 gacggtgggacccggccacttccacatcggggtcccgctgtgggctgtagggtgttcagt  
 gacgtccctgcttttacctgccaggtgaagagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc  
 caaaagggtgcagacaaccacgtgtctatcagcagatga  
 .....

## 1.13 &gt;NALP9/Py13

MAESFFSDFG LLWLKELRK EEFWKFKELL KQPLEKFEK PIPWAEKKA SKEDVAKLLD  
 KHYPGKQAWV VTLNLFQIN RKDLWTKAQE EMRRSILASL FGGSSRGAQL LFCPRWKDLP  
 LWAKVVIVFD PGETFRDAY GAVREEVDTH PAGHISRISP GATNGVTDIT ARLSSRPSSI  
 LSA

## &gt;NALP9/Py13.cdna

atggcagaatcttttttttcggattttggcttgtgtggtatctgaaggagctcagaaaag  
 gaagagttttgaaatttaaggagctcctcaaaacacctttggagaaatttgaactcaag  
 ccaatcccctgggctgagctgaagaaggcctccaaagaagatgtagcaagctgctggac  
 aaacattaccaggaagcaggcatgggaggttaacactgaacctgtttctacagatcaat  
 aggaagatctctggacaaaggctcaggaagagatgagaagaagcattcttgcgagcttg  
 tttggaggttctagtaggggagcacagcttctctctgcccgcgagtggaaggaccttct  
 ctatgggcaaaaggttgtcatcgtctttgaccaggggagactttcaggacggacgcata  
 ggagcagtgagggaagtggaacccacccagctggccacatcagccgaatttagcct  
 gggcgaccaaagggtgacagacatcacagccaggttgcctcagctcctggaagcatt  
 ctttctgcataa  
 .....

## 1.14 &gt;NALP10/Py14

MAMAKARKPR EALLWALSDL EENDFKKLKF YLRDMTLSEG QPPLARGELE GLIPVDLAEL  
 LISKYGEKEA VKVVLKGLKV MNLLLELDQL SHICLHGVGW HWKDNSRQKK VLDWATGTLY  
 PGRFDYVFYV SCKEVVLLE SKLEQLLFWC CGDNQAPVTE ILRQPERLLF ILDFDELQR  
 PFEEKLKKRG LSPKESLLHL LIRRHTLPTC SLLITRPLA LRNLEPLLKQ ARHVHILGFS  
 EEERARYFSS YFTDEKQADR AFDIVQNDI LYKACQVPGI CWVVC SWLQG QMERGKVVLE  
 TPRNSTDIFM AYVSTFLPPD DDGGCSELSR HRVLRSLCSL AAEGIQHQRF LFEEAEELRKH  
 NLDGPRLAAF LSSNDYQLGL AIKKFYFRH ISFQDFHAM SYLVKEDQSR LGKESRREVQ  
 RLLEVKEQEG NDEMTLTMQF LLDISKDSF SNLELKFCFR ISPCLAQDLK HFKEQMESMK  
 HNRTWDLEFS LYEAKIKNLV KVFR

## &gt;NALP10/Py14

atggccatggccaaggccagaaagccccgggagggcattgctctggccttgagtacacct  
 gaggagacagatttcaagaagttaaagtctacttacgggatatgacctgtctgagggc  
 cagccccactggccagaggggagttggagggcctgattccggtggacctggcagaatta  
 ctgatttcaaagtatggagaaaaggaggtgtgaaagtgtcctcaagggttgaaggctc  
 atgaacctgttgaacttggaccagctcagccatatttgtctgcatggggctcggtgg  
 cactggaagacaactctcgccagaaaaaggtgttgactgggccaccgggtactctgtac  
 ccaggccggtttgattatgtctttatgtaagctgcaagaagtggtcctgctgctggag  
 agcaaacctggagcagctcctttctgtgtgctgctgggacaatcaagccccgtcacagag  
 attctqaqcaqccaqcaqccctctctcctcctgagtggttggatgagctgcagagg

Forts. Fig. 1

cccttgaagaaaagttgaagaagaggggtttgagtcaccaaggagagcctgctgcacctt  
 ctaattaggagacatacactccccacgtgctcccttctcatcaccaccggccctggct  
 ttgaggaatctggagcccttctgctgaacaagcagctcatgtccatctcctaggtctctct  
 gaggaggagagggcgaggtacttcagctcctatttcacggatgagaagcaagctgaccgt  
 gccttcgacattgtacagaaaaatgacattctctacaaagcgtgtcaggttccaggcatt  
 tgctgggtggtctgctcctggctgcaggggcagatggagagaggcaagttgtcttagag  
 acacctagaaacagcactgacatcttcatggcttacgtctccaccttctgcccgcgat  
 gatgatgggggctgctccgagcttcccgccacagggctcctgaggagtctgtgctcccta  
 gcagctgaagggaattcagcaccagaggttccctatttgaagaagctgagctcaggaaacat  
 aatttagatggccccaggttggcgcttctctgagtagtaacgactaccaattgggactt  
 gccatcaagaagttctacagcttccgcccacatcagctccaggactttttcatgccatg  
 tcttacctggtgaaagaggaccaaagccggctggggaaggagtcccgagagaagtgcga  
 aggctgctggaggtaaaaggagcaggaagggaatgatgagatgacctcactatgcagttt  
 ttactggacatctcgaaaaagacagcttctcgaaacttgagctcaagttctgcttcaga  
 attctcctctgttttagcgaggatctgaagcattttaagaacagatggaatctatgaag  
 cacaacaggacctgggatttgggaattctcctgtatgaagctaaaataaagaatctggtga  
 aaagtattcagatga

1.15

&gt;NALP11/Py15

MAESDSTDFD LLWYLENLSD KEFQSFKKYL ARKILDFKLP QFPLIQMTKE ELANVLPISY  
 EGQYIWNMLF SIFSMRKED LCRKIIGRRN HVFYILQLAY DSTSYYSANN LNVFLMGERA  
 SGKTIIVINLA VLRWIKGEMW QNMISYVVHL TSHEINQMTN SSLAELIAKD WPDGQAPIAD  
 ILSDPKKLLF ILEDLDNIRF ELNVNESALC SNSTQKVIP VLLVSLKLRK MAPGCWFLIS  
 SRPTRGNVVK TFLKEVDCCT TLQLSNGKRE IYFNSFFKDR QRASAALQLV HEDEILVGLC  
 RVAILCWITC TVLKRQMDKG RDFQLCCQTP TDLHAHFLAD ALTSEAGLTA NQYHLGLLKR  
 LCLLAAGGLF LSTLNFSGED LRCVGFTEAD VSVLQAANIL LPSNTHKDRY KFIHLNVQEF  
 CTAIAFLMAV PNYLIPSGSR EYKEKREQYS DFNQVFTFIF GLLNANRRKI LETSFGYQLP  
 MVDSEFKWYSV GYMKHLDRDP EKLTHHMLPF YCLYENREEE FVKTIVDALM EVTIVYQSDK  
 DMMVSLYCLD YCCHLRTLKL SVQRIFQNK EPLIRPTARLS YVSTASGFED LLKALARNRS  
 LTYLSINCTS ISLNMFSLLH DILHEPTCQI SHLX

&gt;NALP11/Py15.cdna

atggcagaatcggattctactgactttgacctgctgtggtatctagagaatctcagtgac  
 aaggaatttcagagttttaagaagtatctggcagcaagattcttgatttcaaaactgcca  
 cagtttccactgatacagatgacaaaagaagaactggctaactgttgccaatctcttat  
 gagggacagtatatatggaatatgctcttcagcatatttcaatgatgcgtaaggaagat  
 ctttgtaggaagatcattggcagacgaaaccatgtgttctacatacttcaattagcctat  
 gattctaccagctattattcagcaaaacatctcaatgtgttctgatgggagagagagca  
 tctggaaaaactattgttataaatctggctgtgttgagggtggatcaagggtgagatgtgg  
 cagaacatgatctcgtacgtcgttcacctcacttctcacgaaataaaccagatgaccaac  
 agcagcttggctgagctaatcgccaaggactggcctgacggccaggctcccatcgagac  
 atcctgtctgatcccaagaaactcctttctcctcgaggacttggaacataagattc  
 gaggtaaatgtcaatgaaagtgtcttgtgtagtaacagcaccagaaagttcccattcca  
 gtctcctggtcagtttgctgaagagaaaaatggctccaggctgctgggtcctcatctcc  
 tcaaggccccacagctgggaataatgtaaaaacgttcttgaaagaggtagattgctgcacg  
 acctgacagctgtcgaatgggaagagggagatatattttaactcttctttaagaccgc  
 cagagggcgctcggcagccctccagcttgtacatgaggatgaaatactcgtgggtctgtgc  
 cgagtcgccatcttatgctggatcacgtgtactgtcctgaagcggcagatggacaagggg  
 cgtgacttccagctctgctgccaaacacccactgatctacatgccactttcttctgtgat  
 gcgttgacatcagaggctggacttactgccaatcagatcacctaggtctcctaaaacgt  
 ctgtgttctgctggctgcaggaggactgttctgagcaccctgaatttcagtggtgaagac  
 ctgagatgtgttgggttactgaggctgatgtctctgtgttgaggccgcgaatattctt  
 ttgccgagcaacactcataaagaccgttacaagttcatacacttgaaacgtccaggagttt  
 tgtacagccattgcatttctgatggcagtaaccaactatctgatccctcaggcagcaga  
 gagtataaagagaagagagaacaatactctgactttaatcaagtgttactttcattttt  
 ggtcttctaaatgcaaacaggagaaagattcttgagacatcctttggataccagctaccg  
 atggtagacagcttcaagtgggtactcgggtgggatacatgaaacatttggaccgtgacccg  
 gaaaagttgacgcaccatattgcctttgttttactgtctctatgagaatcgggaagaagaa

Forts. Fig. 1

```

tttgtgaagacgattgtggatgctctcatggagggttacagtttaccttcaatcagacaag
gatatgatggtctcattatactgtctggattactgctgtcacctgaggacacttaagttg
agtgttcagcgcattcttccaaacaaagagccacttataaggccaactgctaggttgcc
tatgtctcgactgcttctggttttgaagacttactcaaggctttggctcgtaatcggagc
ctgacataacctgagtatcaactgtacgtccatttccctaaatatgttttcacttctgcat
gacatcctgcacgagcccacatgccaaataagtcattctgagn

```

## 1.16 &gt;Py16 (mouse)

```

MASFFSDFGLMWYLEELNKKEFMKFKEFLKQEIQLRLKQISWTEVKKASREDLANLLLK
HYEEKAWDMTFKIFQKMNKDLMERAGREIAGLSNTGPPDRYEAPNTHTVEDFQVCVHS
EMMHLTLKRLQAPGNLEARI PMVIEATVVFKKTGEPDAIALEVELQMGPDLSCLPNVSA
YRVLDIVLPEDPAIPLLLGIYPEDVPTVRPGYPKTAEEQSDLSKSHLMKIIEDFKEIINNS
LKEIQENSGKQV

```

## &gt;Py16.dna

```

atggcttcttttttttctgattttggccttatgtggtacttagaagagctaaacaagaaa
gaattcatgaagtttaaggaattcctcaaacaggagattttgcagttgagactgaaacag
atttcttggaccgaagtgaagaaggcatctcgtgaagaccttgccaacttactgttgaaa
cattatgaggagaagaaagcctgggatatgaccttcaaaatcttccagaagatgaatagg
aaggatctcatggagagggcaggaagagagattgctggtctctcaaacactggaccacca
gacagatatgaggccccaacacacatacagtagaggacttccaggtctgtgttcattca
gagatgatgcacctaacctcaagagactgcaggccccagggaatttagaggccaggatt
ccaatggtcatagaagcaactgttgattcaagaaaactggggagcctgatgctattgcc
ttggaagtggaaacttcagatgggacctgatttgcctcatgcatattacccaatgtgtcggt
taccgagttatggacatagtagtaccggaggatcccgcaataacctctcctgggcataat
ccagaagatgttccaaccgtaagaccaggctaccctaaaacagctgaagaacaagattct
gacctaaaatcccatctcatgaagataatagaagactttaaggagattataaacaattca
cttaagaaaatacaggaactcaggcaaacagggtataa

```

## 1.17 &gt;NALP13/Py17

```

MYEFYIHKGY DDVSSDNSRE KIKGEPESECE LGHFPRIPWA NLRAADPLNL SFLIDEHFPK
GQAWKVVGLI FQTMNLTSLC EKVRAEMKEN VQTQELQDPT QEDLEMLEAA AGNMQTQGCQ
DPNQEELDEL EEBTGNVQAQ GCQDPNQEEP EMLEADHRR KYRENKMAEL LETWDNISWP
KDHVYIRNTS KDEHEELQRL LDPNRTRAQA QTIVLVGRAG VGKTTLAMRA MLHWANGVLF
QQRFSYVFYL SCHKIRYMKE TTFaelisLD WPDFDAPIEE FMSQPEKLLF IIDGFEEIII
SESRSSELDG GSPCTDWYQE LPVTILHSL LKKELVPLAT LLITIKTWV RDLKASLVNP
CFVQITGFTG DDLRVYFMRH FDDSSEVEKI LQQLRKNETL FHSCSAPMVC WTVCSCLKQP
KVRYLDLQSI TQTTTSLYAY FFSNLFSTAE VDLADDSWPG QWRALCSLAI EGLWSMNFTE
NKEDTEIEGL EVPFIDSLYE FNILQKINDC GGCTTFTHLS FOEFFAAMS FVLEEPREFPP
HSTKPQEMKM LLQHVLLDKE AYWTPVVLFF FGLLNKNIAE ELEDTLHCKI SPRVMEELLK
WGEELX

```

## &gt;NALP13/Py17.cdna

```

atgagtgcagtgaaatccaccctctgacacccccattcccttttcatcctcctccactcac
agttctcatattccgccttgacattctctgtaccctggctccccatgtgaaaatggg
gtcatgctgtacatgagaaacgtgagccatgaggagctacaacgggttcaagcagctctta
ctgactgagctcagtagtgccacatgcccacacctgggaccaggtcgagacagccagc
tgggcagaggtgggttcatctcttgatagagcgtttccctggacgacgcgttgggatgtg
acttcgaacatctttgccattatgaactgtgataaaatgtgtgtgtgtagtccgcagagag
ataaatgccattctgcctaccttggaaccagaggacttgaatgtgggagaaacacagggtg
aatctggagggaaggagaatctggtaaaatcggcggtataaatcgaatgtgatggaaaag
tttttccccatattgggacattacgacttggcctggaaaccagagggacttcttctaccaa
gggtgtacacagggcacgaggagtacttaccatgtctgtcttctgcccacaaagacccagggt
agacagcccagacgtggccatacagggagctcctgggagtcggaaaaacaatcctggcc
aaaaagggtgatgtttgagtgggccagaaacaagttctacgcccacaagcgtggtgtgct
ttctacttccattgccaagaggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt
gtgacaaaagggtggcctggatctcaggacctcgtgtcagaagattatgtccaaaccgaccaa
cttctgctgctcttggtgggtttgaggagctcacatctaccctcattgacagactggag
gacctgagtgaagactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagtttgctg

```

Forts. Fig. 1

agcaaaacgatgcttccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag  
 acatgcaagcccttgcgtgaaatgtccctctctcgtaacccttccggggtttaatacagatg  
 gaaaaaatcaagtatttccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg  
 agtttcgcccattggaaaacaccattctcttctccatgtgccgggtccctgtggtttgctgg  
 atggctcgtcttggctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcagtg  
 ccaaatgccacctctgtgttcgtccggtatatttctagcttgtttcccaccagagctgag  
 aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggctctgtgtcacttggccgcagac  
 agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaaagccaagctggat  
 cagacgggagtcaccgccttcccttggcatgagatattcttcggagaattgcaggtgaggaa  
 gaccactatgtctttaccctcgtgacttttcaggaatttttgcggccttgttttatgtt  
 ctctgtttccacaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc  
 ctgatagcaggtccagaggaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttattc  
 ggttttctgaacgaggctgcgcttcggccgtggaacagtcattccaatgcaagggtgtct  
 ttcggtaataagaggaaactgctgaaagtcatacctctgttgcataaatgtgacccacct  
 tctccgggcagtggggtcccgcagttattctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc  
 tttgtaagccaagccctaaatgattatcataaagtgtcttgagaattggcaacaacaaa  
 gaagttcaagtgtctgcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg  
 accgtcaccctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggctct  
 gacctaaggcgtgtgaaatagcaccatgttgaaccaggacttaatcggtgttttgacgggg  
 aaccagcatctgagataacttggaataacaacatgtggaagtggagtcctaaagctgtgaa  
 ctctctgaggggtgtgagatcccccggtgcgctctgcagtgctcaggttggagac  
 tgcttggccacccctagaatttggactgtatcttgcaataatcttcaaggttaacgggcat  
 ctaagactctcactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgtattacctgtct  
 gtggccagctggagaggctgtcgcagagtaagatgtgacccacctgagcttggcagaa  
 aacgccttgaagatgaaggggccaagcatatttggaaatgcctgccacacctgagatgt  
 cctctgcagaggctgtgactgagaaagtgtgacttgaccttaattgctgtcaggatatg  
 atctctgcgctctgtaaaaataaaacccctgaaaagtcttgacctaaagttaatagcctg  
 aaggatgatggggtgatcctgtgtgtgaggccctgaagaacctgactgtacattacag  
 atcctggagctggaaaactgcctgttcaacctccatctgctgcccaggccatggcttccatg  
 ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagctctat  
 ggtattctgaccttgtgcgaggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcattttc  
 actattcacaatagccaagatttggaaagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata  
 aagaaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
 tgtagaacaatggtatcatagaacagcacactgggtgtcagggtcctacttgcctcata  
 ttaccaagaatccacttttcccccaaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
 agagacaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac  
 aaggagaatttccagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca  
 tgctctattccacagtttgaatcgagaatgccacgtggaatgtctggcactcctcttg  
 catgagttatttggagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg  
 aacctgcgaacctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
 cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgccaggaatttcacaa  
 gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaaatttcacaagct  
 atggaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaaatttcacaagctatg  
 gaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggaatggaggtgacacatgg  
 gactacaagagtcacgtgatgacaaaattcgctgaggaggaggatgtacgtcgtagttt  
 gaaaaactgctgctgactggcgggaaatgcaaacgttggctgggtgtctttgattcagac  
 cgggtggggcttccggcctcgacgggtgttctgcacggaaagttaggaattgggaaatcg  
 gctctagccagaaggatcgtgtgtgtgtggcgcaagggtggactctaccagggaatgttc  
 tctacgtcttcttctccctccttagagagatgcagcggaaagagagagcagtgctcaca  
 gagtcatctccaggagtgccagactcccagggtccggtgacggagatcatgtcccga  
 ccagaaaggctgtgttcatcatgacgggttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
 gacacaaagctctgcaaaagactgggctgagaagcagcctccgttcacctcatagcagct  
 ctgctgaggaaggctcctgctcctgagtccttctgatcgtcaccgtcagagacgtgggc  
 acagagaagctcaagtcagaggtcgtgtctccccgttacctgttagttagaggaatctcc  
 ggggaacaaagaatccacttgccttgagcggggttgggtgagcatcagaagacacaa  
 ggggtgctgcatcatgaacaacctgagctgctcgaccagtgccagggtgccgcgctg  
 ggctctctcatctgctggcctgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc  
 ttcaaccaaagctcacaggcctgcacggcgttttgtgttcatcagctcaccctcga

Forts. Fig. 1

ggcgtgggtccggcgctgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgcttctgccgt  
 atggctgtggaggagtggtgaataggaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatggtt  
 caaggactcggggagtgctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctccagac  
 agccactgtgaggagtactacaccttctccacctcagtcctccaggacttctgtgccgac  
 ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgccctctgtacgttgag  
 aagacaaagaggtccatggagcttaaacaggcaggttccatataccactcgctttggatg  
 aagcgtttctgtttggcctcgtgagcgaagcgttaaggaggccactggaggctcctgctg  
 ggctgtcccgttcccctgggggtgaagcagaagcttctgactgggtctctctgttgggt  
 cagcagcctaatagccaccacccaggagacacctggacgcttccactgtcttttcgag  
 actcaagacaaagagtgtgttcgcttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttcog  
 attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgctccagcactgtccgtatttg  
 cggaaaattcgggtggatgtcaaagggatcttccaagagatgagtcgctgaggcatgt  
 cctgtgggtccctctatggatgcgggataagacctcattgaggagcagtggaagatttc  
 tgcctcatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
 acagagcggggccatgaagacctgtgtgccagctgaggcatccacctgcaagatacag  
 acctgatgtttagaaatgcacagattaccttgggtgtgcagcacctctggagaatcgte  
 atggccaacctgaacctaaagatccctcaacttgggaggcaccacctgaaggaagaggat  
 gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttgaggtctttgaggctg  
 gattgctgtggattgacctatgctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc  
 ccagcctgaaatctctgagcctggcaggaaacaaggtgacagaccaggagtaaatgcct  
 ctcaagtgtgcttgagagctctccagtgccctgcagaagctgatactggaggactgt  
 ggcacacagccacgggttgccagagcttggcctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
 acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga  
 tccatgaggcttcccactgtagtctgcagaggctgtatgctgaatcagtgccacctggac  
 acggctgggtgtgtgtttcttgcacttgccttatgggtaactcatggctgacgcacctg  
 agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgcgaggtcatgaga  
 gaacctatcttgcctcctcagacctggagttggtaaggtgtcatctcaccgcccgtgc  
 tgtgagagctgtgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg  
 gacaatgccctgggtgacggtgggttgctgcactgtgcgagggactgaagcaaaagaac  
 agtgttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgattgctgtgaggca  
 ctctccttggcccttctcctgaaccggcatctgaccagtctaaacctgggtgcagaataac  
 ttcaagtcaccaaggaatgatgaagctgtgttcggccttgcctgtcccacgtctaaacta  
 cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtgtt  
 ttgcttaaagtcactgtttccaagaacctatcaatgacattaaaggagaacttactgtac  
 ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaattcatggatgg  
 actgaaaggctgtggaatggcagctaccctgtgcaaataaggaagctgtggaggaaagtg  
 cagctactcaagccccgagtcgtaattgacggtagttggcattcttttgatgaagatgac  
 cgattggatcttcaaagccagcaaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
 gcatcacagaaagtcagatcccatcaacctgccacattccgttggatagaagcactgct  
 gacgggtgggaccggccacttccacatcgggggtcccgcctgtgggctgtagggtgttcagt  
 gacgtccctgcttttacctgccaggtgaagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc  
 caaagggtgcagacaaccacgtgtctatcagcagatga

1.18

\*\*\*\*\*  
 >NALP14/Py18 (mouse)  
 MGASLWYGPQ VVPVTGDQKF CLTLTPAHLA DFGFIWYWE LNKIEFMYFK ELLIHEILQM  
 GLKQISWTEV KEASREDLAI LLVKHCDGNQ AWDTTFRVFQ MIGRNVITNR ATGEIAHST  
 IYRAHLKEKL THDCSRKFNI SIQNFQDEY DHLENLLVPN GTENNPKNMV LQGVAGIGKT  
 ILLKNLMIVW SEGLVFQNKF SYIFYFCCHD VKQLQTASLA DLISREWSPSAPMEEILSQ  
 PEKLLFIIDS LEGMEWNVTQ QDSQLCYNM EKQPVNVLLS SLLRKKILPE SLLISTSCE  
 TFKDLKDIE YTNVRTITGF KENNINMCFH SLFQDRNIAQ EAFSLIRENE QLFTVCQAPV  
 VCYMVATCLK NEIESGKDPV SICRRTTSLY TTHILNLFIP HNAQNPSNNS EDLLDNLCLF  
 AVEGMWTDIS VFNEEALRRN GIMDSDIPTL LDIGILEQSR ESENSYIFLH PSVQEFCAAM  
 FYLLHSEMDH SCQGVYFIET FLFTFLNKIK KQWVFLGCF FGLLHETEQE KLEAFFGYHL  
 SKELRRQLFL WLELLDTHL PDVKKINTMK FFYCLFEMEE EVFVQSAMNC REQIDVVVKG  
 YSDFIVAAYC LSHGSALTDF SISAQMC  
 >NALP14/P18.cdna (mouse)  
 atgggtgcctccttatgggtatggcctcaagttgtaccagtcactgggtgatcaaaagttc  
 tgccctcacccttaccacagcacatctgcagattttggcttatatgggtactggaaagag

Forts. Fig. 1

ctaaacaagatagaattcatgtatttttaaggaattactcatacatgaaattctgcaaatg  
 ggtctaaaacagatttcttggactgaagtaaaggaagcatctcggaagaccttgccatc  
 ttactggtaaaccattgtgacgggaatcaagcctgggatacgaccttcagagctctccag  
 atgattgggaggaatgttatcactaatagggaacaggagagattgctgcacactcaaca  
 atatatcgagctcatttaaaggagaagctgacctgattgttctagaaagttcaacatc  
 agtattcagaatttcttccaggatgaatatgatcatcttgagaaccttcttgtaccaaat  
 ggaactgaaaacaatccaaagatgggtgtcctgcaagggtgtagctggaattggcaagact  
 attctgttaaaaaatttaattgattgtctggtcagaaggcctggtatttcagaacaaattc  
 tcttatatcttctacttctgtctgcatgattggaagcaattgcagacagcaagcctggct  
 gatctgatctccagagagtggcctagccctcagctcccatggaggagatcctatcccaa  
 cctgagaaactcttattcatcattgacagcttagaagggtggaatggaatgttacccaa  
 caggattcgcagctgtgttacaattgcatggagaagcagccagtaaatgtattgtgagc  
 agtttgcaggaagaagatactccctgaatcatctctcctcatctccactagtgtgag  
 acttttaaggatttgaaggactggattgagtagacacaaatgtgagaacaataaccggattc  
 aaggaaaaacaatattaatatgtgttccacagctgttccaagataggaacattgccag  
 gggccttcagtttgataagagaaaatgagcagctgttactgtatgtcaggccctgtg  
 gtctgtctacatgggtggctacttgtcttaaaaatgagatagagagtggaagaccagtc  
 tccatctgccgagctaccacctccctgtataccactcacatcttaaatgttctatccc  
 cacaatgcccaaaatccaagtaacaatagcgaagacctgctggataactgtgtgttctta  
 gctgtagaggcatgtggactgatatactgtgtttaatgaggaggctctaaggagaaat  
 gggatcatggattctgacatccccacactgctggatattggaattcttgagcagagcagg  
 gaactctgaaaattcttatacatatctccaccctgtgtccaggagttctgtgcggccatg  
 ttttatctgtacatagtgaatggatcactcttgtcagggtgttactttatagaaaca  
 ttctgtttacttttctaaacaagatcaaaaaacagtggttttttgggctgtttcttc  
 tttggtcttttcatgaaacagaacaagaaaagctggaggcatttttggctaccactta  
 tctaagaatttaaggcgacagtgtttttgtggctggaactcctattggacactttacat  
 cctgacgttaaaaaataataaccatgaagtcttttactgtctgtttgagatggaagag  
 gaagtctttgtacagtcagcaatgaactgtagggaacagattgacgttgtggttaaggt  
 tattctgattttattgttgcctactgcttaagccatggctctgcactgacagacttc  
 tccatttcagctcaaatgtgctga

1.19

&gt;NALP15/Py19.hs

LEELKKEEFRKFKEHLKQMTLQLELKQIPWTEVKKSIREELANLLIKHYEEQQAWNITLRIFQKM  
 DRKDLCKMVMRERTGYT....  
 XYTKTYQAH KQKFSRLWSS KSVTEIHLFY EEEVKQEECD HLDRLFAPKE AGKQPRTVII  
 QGPQGIGKTT LLMKLMMAWS DNKIFRDRFL YTFYFCCREL RELPPTSLAD LISREWPDPA  
 APITEIVSQP ERLLFVIDSF EELQGGLENEP DSDLCGDLME KRPVQVLLSS LLRKKMLPEA  
 SLLIAIKPVC PKELRDQVTI SEIQPRGFN ESDRLVYFCC FFKDPKRAM AFNLVRESEQ  
 LFSICQIPLL CWILCTSLKQ EMQKGKDLAL TCQSTTSVYS SFVFNLFTE GAEGPTPQTQ  
 HQLKALCSLA AEGMWDTFE FCEDDLRRNG VVDADIPALL GTKILLKYGE RESSVFLHV  
 CIEFCAALF YLLKSHLDHP HPAVRCVQEL LVANFEKARR AHWIFLGCFI TGLLNKKEQE  
 KLDAFFGFQI SQEIKQQIHQ CLKSLGERGN PQGQVDSLAI FYCLFEMQDP AFVKQAVNLL  
 QEANFHIIDN VDLVVSAYCL KYCSSLRKLC FSVQNVFKKE DEHSSTSDYS LICWHHICSV  
 LTTSGHLREL QVQDSTLSES TFVTWCNQLR HPSCRLQKLG INNVSFSGQS VILFEVLFYQ  
 PDLKYSFTL TKLSRDDIRS LCDALNYPAG NVKELALVNC HLSPIDCEVL AGLLTNNKKL  
 TYLNVSCNQL DTGVPLLCBA LCSPDTVLVY LMLAFCHLSE QCCEYISEML LRNKSRYLD  
 LSANVLKDEG LKTLCEALKH PDCCLDLCL VKCFITAAGC EDLASALISN QNLKILQIGC  
 NEIGDVGVLQ LCRALHTTDC RLEILGLEEC GLTSTCCKDL ASVLTCSKTL QQLNLTNLTL  
 DHTGVVVLCE ALRHPECALQ VLGLRKTFD EETQALLTAE EERNPNLTIT DDCDTITRVE  
 I

&gt;NALP15.hs.dna (partial)

gccccgcga aacctcacgc ccccccaac tacggcagta cgagccggtt aaatcgagc  
 agattatcat gttctgtgca cgtctcttga ggattggat ctctgctcca gaaaagatgg  
 cagcctcttt ctgctctgat ttggtcttat gtggtatctg gaggagctca aaaaggagga  
 gttcaggaaa ttaagaac atctcaagca aatgacttgc agctgaactc aagcagattc  
 cctggactga ggtcaaaaa agcatcccg gaagaacttg caaacctctt gatcaagac

Forts. Fig. 1

1.20

tatgaagaac aacaagcttg gaacataacc ttaagaatct ttcaaaagat ggatagaaaag  
gatctctgca tgaaggtcat gaggagagaga acaggatata caaagaccta tcaagctcac  
gcaaagcaga aattcagccg cttatggtcc agcaagtctg tcaactgagat tcacctatac  
tgtgaggagg aagtcaagca agaagaatgt gaccatttgg accgcctttt tgctcccaag  
gaaactggga aacagccacg tacagtgatt attcaaggac cacaaggaac tcggaaaaaa  
cgacactcct gatgaagctg atgatggcct ggctcgacaa caagatcttt cgggataggt  
tcgtgtacac gtgctatttc tgctgcagag aactgagg

&gt;NALP12/Py20.mm\*

MTSVRCKLAQ YLEDLEDVDL KFKMHLEDY PPEKGCIPVP RGQMEKADHL DLATLMIDFN  
GEEKAWAMAV WIFAAINRRD LWEKAKKDQP EWNDTCTSHS SMVCQEDSLE EEWMLGLGYL  
SRISICKKKK DYCKMYRRHV RSRFYSIKDR NARLGESVDL NSRYTQLQLV KEHPSKQERE  
HELLTIGRTK MRDSPMSSLK LELLFEPEDG HSEPVHTVVF QGAAGIGKTI LARKIMLDWA  
LGKLFKDKFD YLFFIHCREV SLRTPRSLAD LIVSCWDPDN PPVCKILRKP SRILFLMDGF  
DELQGFDEH IGEVCTDWQK AVRGDILLSS LIRKKLLPKA SLLITTRPVA LEKLQHLLDH  
PRHVEILGFS EAKRKEYFFK YFSNELQARE AFRLIQENEV LFTMCFIPLV CWIVCTGLKQ  
QMETGKSLAQ TSKTTTAVYV FFLSSLLQSR GGIEEHLFSD YLQGLCSLAA DGIWNQKILF  
EECDLRKHGL QKTDVSAFLR MNVFKQEVDC ERFYSFST

&gt;NALP12/Py20.cdna

atgacgagtgctccgttgcaagctggctcagtatctagaggaccttgaagatgtggacctc  
aagaaattcaaaatgcatttggaagattaccgccccgagaaaggctgtatcccagtcctc  
aggggcccagatggagaaggcagatcacttgatctagccacactcatgattgacttcaat  
ggcgaggagaaggcctgggccatggctgtgtggatcttctgctgcgatcaacaggcgagac  
ctctgggaaaaagctaagaaggaccagccagagtggatgacacgtgtacatcacatttc  
tctatgggtatgccaggaggacagccttgaagaagagtggatgggtttgctgggatatttc  
tcccgcattctccatttgaataaagaagaagattactgtaagatgtacagacgacatgtg  
agaagcaggttctactctatcaaggacaggaacgcgcgtctaggtgagagtgtggacctc  
aacagtcgctacacgcagctccaactgggtcaaggagcatccaagcaagcaggagcgggag  
catgaactcctgaccatcgcccgactaaaaatgcgggacagccccatgagttcccttaag  
ctggagctgctgtttgagcccgaggacgggcactcggagcctgtgcacacagtgggttc  
caggggagcagcaggcatcgggaaaaccatcctagccaggaagattatgttgactgggca  
ctgggaaagctcttcaaagacaaatttgactatttgttctttatccactgccgagaggtg  
agcctcaggacgccaaggagtctagcagacctgattgtcagctgctggcctgacccaaac  
ccaccagtgtgcaagatcctgcgcaagccttcaggatcctcttctcatggatggcttt  
gatgagctacaaggggcctttgacgagcacattggggaggtctgcacagactggcctaaag  
gctgtgcggggagacattctgctaagcagcctcatccgaaagaaactgctgcccaggcc  
tctctgctcataacgacgaggccggtagccttgagaaactgcagcatctcctggaccac  
ccccgcatgtggagatcctaggtttctctgaggccaaaaggagagatttctttaaag  
tatttctccacagagctgcaggcccgaggccttcaggctgatccaagagaatgaggtc  
ctctttaccatgtgcttcatccccctggctgctggattgtgtgcacggggctaaagcaa  
cagatggagaccgggaagagcctggcccagacctccaagaccactacggcgtctacgtc  
ttcttctttccagcctgctgcaatcccggggggcattgaggagcatctcttctctgac  
tacctacaggggctctgttctactggctgcggatggaatttggaaccagaaaatcctattt  
gaggagtgtgatctgcggaagcacggcctgcagaagactgacgtctccgcttctctgagg  
atgaacgtgttccagaaggaaaggactgcgagagattctacagcttcagcacatga

Fig. 2

## The PYD family summary

## A) Human proteins cloned and sequenced in our laboratory (NALP6 only partially)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
✓ Pycard		No EST	From N. Tidow	16p13.3	PYD; B-Box; SPRY
✓ Pyc		>40	From ESTs	16	PYD; CARD
✓ NALP1		>3	From EST	16	PYD
✓ NALP2	Py7	>20	From Kiaa		PYD; NACHT; LRR; X; CARD
✓ NALP6		>30	From NEDO	19	PYD; NACHT; LRR
	Py9	>10	From EST (partial)	11	PYD; NACHT; LRR

## B) Human proteins partial sequences from genomic databases matching public ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
✓ NALP3	Py5	>3		19	PYD; NACHT; LRR
✓ NALP7	Py11	3		19	PYD; NACHT; LRR
✓ NALP10	Py14	1		2	PYD; NACHT; LRR
✓ NALP11	Py15	3		19	PYD; NACHT; LRR
✓ NALP15	Py19	>3		19	PYD; NACHT; LRR

Forts. Fig. 2

## C) Human proteins partial sequences from genomic databases matching no public human ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
NALP4 ✓	Py6	1 pot from mouse		11	PYD; NACHT; LRR
NALP5 ✓	Py8			19	PYD; NACHT; LRR
NALP8 ✓	Py12			19	PYD; NACHT; LRR
NALP9 ✓	Py13			19	PYD; NACHT; LRR
NALP13 ✓	Py17			19	PYD; NACHT; LRR
Py10 ✓				11 or 3	PYD

## D) Mouse "new" proteins partial sequences from genomic databases matching no public ESTs apparently (1 est for NALP14 and 1 EST in a human sequence for NALP12 but no PYD for the moment in this partial human sequence)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
Py16 ✓					PYD ... interesting to follow
NALP12 ✓	Py20	-			PYD; NACHT; LRR
NALP14 ✓	Py18	1			PYD; NACHT; LRR

```

ID    PYD_DOMAIN; MATRIX.
AC    ZZ999999;
DT    Mon Oct 30 13:50:41 2000
DE    Generated from MSF file: 'stdin'.
MA    /GENERAL_SPEC: ALPHABET='ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ';
LENGTH=82;
MA    /DISJOINT: DEFINITION=PROTECT; N1=6; N2=77;
CC    Automatic scaling using medium database
MA    /NORMALIZATION: MODE=1; FUNCTION=LINEAR; R1=1.0442;
R2=0.01858709; TEXT='NScore';
MA    /CUT_OFF: LEVEL=0; SCORE=401; N_SCORE=8.5; MODE=1;
MA    /CUT_OFF: LEVEL=-1; SCORE=293; N_SCORE=6.5; MODE=1;
MA    /DEFAULT: M0=-8; D=-20; I=-20; B1=-60; E1=-60; MI=-105;
MD=-105; IM=-105; DM=-105;
MA    /I: B1=0; BI=-105; BD=-105;
MA    /M: SY='L'; M=-11,-28,-22,-29,-20,12,-29,-16,15,-
26,38,18,-28,-29,-17,-18,-28,-11,5,-9,7,-18;
MA    /M: SY='E'; M=-10,11,-28,19,39,-27,-17,-1,-29,10,-22,-
19,2,-5,13,4,2,-7,-26,-28,-15,26;
MA    /M: SY='E'; M=-12,22,-26,22,26,-24,-13,3,-26,3,-23,-
18,20,-11,13,-1,2,-7,-28,-31,-16,20;
MA    /M: SY='L'; M=-9,-30,-20,-31,-22,8,-31,-22,24,-
29,42,19,-29,-29,-21,-21,-27,-9,17,-21,-1,-22;
MA    /M: SY='S'; M=-2,5,-19,3,2,-21,-2,-8,-20,-4,-22,-16,10,-
11,-2,-5,14,6,-15,-33,-18,0;
MA    /M: SY='E'; M=0,2,-27,5,11,-30,-12,-2,-25,10,-24,-
13,0,1,10,1,0,-7,-21,-26,-15,9;
MA    /M: SY='D'; M=-14,17,-29,26,26,-25,-18,-1,-24,5,-20,-
18,5,-10,6,-3,-3,-9,-21,-28,-10,15;
MA    /M: SY='E'; M=-11,18,-28,24,45,-30,-16,2,-29,7,-23,-
20,11,-5,17,-1,2,-8,-30,-32,-20,31;
MA    /M: SY='L'; M=-12,-28,-19,-31,-22,30,-28,-19,11,-
29,33,11,-24,-29,-25,-19,-23,-8,6,-12,8,-22;
MA    /M: SY='K'; M=-11,1,-28,1,10,-26,-17,-3,-24,20,-22,-
7,1,-13,15,19,-3,-8,-20,-18,-10,12;
MA    /M: SY='K'; M=-10,-2,-26,-1,10,-23,-18,-6,-26,28,-24,-
12,0,-12,8,26,-2,-2,-18,-22,-8,7;
MA    /M: SY='F'; M=-19,-28,-21,-37,-27,70,-29,-19,-1,-
25,9,0,-19,-29,-36,-17,-20,-10,-1,7,26,-27;
MA    /M: SY='K'; M=-10,-2,-30,-3,8,-29,-21,-9,-25,41,-26,-7,-
1,-11,13,26,-10,-10,-18,-20,-9,10;
MA    /M: SY='F'; M=-9,-12,-23,-13,-1,2,-21,-5,-7,-7,-2,0,-9,-
17,-4,-7,-6,-5,-8,-18,1,-2;
MA    /M: SY='Y'; M=-12,-18,-25,-19,-11,6,-21,-10,-6,0,7,2,-
16,-23,-11,0,-19,-11,-6,-9,10,-11;
MA    /M: SY='L'; M=-10,-28,-21,-28,-16,7,-30,-20,20,-
28,43,18,-27,-27,-18,-20,-27,-10,10,-21,-1,-17;
MA    /M: SY='R'; M=-3,-13,-26,-14,-8,-17,-5,-12,-16,-1,-10,-
7,-9,-12,-4,1,-7,-7,-13,-15,-12,-7;

```

Fig. 3/1

```

MA /M: SY='B'; M=-6,15,-20,14,5,-23,-13,-3,-23,0,-21,-
16,11,-12,2,-1,10,12,-17,-32,-14,3;
MA /M: SY='E'; M=-4,-9,-22,-10,5,-10,-21,-13,-10,3,-10,-5,-
9,-10,-4,1,-4,-1,-5,-22,-10,0;
MA /I: I=-4; MD=-18;
MA /M: SY='P'; M=0,-9,-18,-10,-5,-14,-9,-13,-6,-6,-11,-7,-
5,5,-4,-7,3,1,-6,-21,-12,-6; D=-4;
MA /I: I=-4; MD=-18;
MA /M: SY='L'; M=-8,-18,-10,-19,-11,-3,-24,-9,6,-18,19,10,-
18,-23,-8,-13,-15,-5,3,-23,-4,-10; D=-4;
MA /I: I=-4; MD=-18;
MA /M: SY='E'; M=-5,4,-23,8,23,-26,-10,-3,-25,7,-21,-15,2,-
7,13,8,4,-5,-21,-26,-16,17; D=-4;
MA /I: I=-4; MD=-18;
MA /M: SY='E'; M=-10,-6,-22,-4,6,-7,-18,-4,-13,0,-6,-4,-6,-
5,-2,-1,-7,-5,-12,-20,-6,2; D=-4;
MA /I: I=-4; MD=-18;
MA /M: SY='G'; M=-3,-2,-23,1,3,-23,21,-11,-27,-4,-21,-
15,0,-12,-5,-7,1,-8,-19,-22,-20,-1; D=-4;
MA /I: I=-4; MD=-18;
MA /M: SY='H'; M=-9,-10,-19,-11,-6,-1,-15,11,-6,-12,3,1,-
8,-17,-4,-8,-8,-3,-8,-14,8,-6; D=-4;
MA /I: I=-4; MI=0; MD=-18; IM=0; DM=-18;
MA /M: SY='P'; M=-6,-10,-21,-9,-4,-20,2,-11,-22,-3,-22,-
10,-5,4,0,-5,-1,-8,-20,-23,-17,-3; D=-4;
MA /I: I=-4; DM=-18;
MA /M: SY='R'; M=-10,-5,-26,-6,1,-22,-12,-6,-23,14,-21,-
11,0,-2,6,23,-3,-4,-19,-23,-14,1; D=-4;
MA /I: I=-4; DM=-18;
MA /M: SY='I'; M=-8,-26,-25,-32,-23,-1,-35,-27,36,-
25,17,14,-20,-21,-19,-25,-16,-4,25,-23,-3,-24;
MA /M: SY='P'; M=-2,-14,-30,-10,-2,-25,-17,-18,-18,-8,-25,-
17,-13,54,-8,-14,0,2,-21,-29,-25,-9;
MA /M: SY='W'; M=-16,-19,-37,-19,-8,-12,-20,-9,-22,3,-19,-
12,-16,-16,3,11,-19,-15,-24,42,5,-2;
MA /M: SY='G'; M=5,-4,-20,-7,-11,-14,17,-16,-24,-12,-21,-
16,2,-16,-13,-14,9,1,-15,-24,-17,-11;
MA /M: SY='E'; M=1,2,-24,3,22,-26,-15,-3,-22,5,-18,-13,0,-
2,13,0,3,-4,-21,-27,-17,17;
MA /M: SY='L'; M=-7,-29,-19,-31,-24,3,-30,-23,26,-
25,27,17,-27,-22,-21,-21,-21,-7,24,-24,-5,-24;
MA /M: SY='E'; M=-12,3,-29,8,24,-24,-18,0,-21,8,-13,-10,-
2,-10,10,4,-7,-11,-20,-26,-12,16;
MA /M: SY='K'; M=-5,0,-25,-2,9,-26,-14,-6,-23,20,-21,-7,1,-
11,13,14,-1,-2,-18,-23,-12,11;
MA /M: SY='A'; M=28,-14,-13,-23,-13,-11,-9,-17,0,-13,5,6,-
14,-15,-10,-18,-1,-1,3,-20,-13,-12;
MA /I: I=-6; MI=0; MD=-32; IM=0; DM=-32;
MA /M: SY='D'; M=-10,23,-23,27,5,-27,-6,-4,-26,-1,-26,-
21,18,-13,-1,-1,9,0,-21,-36,-18,1;

```

Fig. 3/2

MA /M: SY='P'; M=-4,-13,-31,-11,-2,-23,-3,-15,-22,0,-22,-  
 14,-10,12,-6,0,-7,-12,-20,-15,-18,-6;  
 MA /M: SY='I'; M=-5,-15,-24,-16,-1,-11,-27,-17,9,-6,5,5,-  
 15,-16,-7,-11,-12,-8,8,-24,-9,-5;  
 MA /M: SY='D'; M=-14,26,-24,35,24,-35,-15,0,-32,8,-26,-  
 20,12,-10,12,-1,-1,-9,-28,-33,-18,18;  
 MA /M: SY='L'; M=-8,-29,-18,-30,-22,7,-29,-20,22,-  
 27,40,21,-29,-29,-20,-19,-26,-8,17,-22,-2,-21;  
 MA /M: SY='A'; M=31,-12,-10,-19,-13,-15,-9,-21,-3,-12,-7,-  
 7,-11,-14,-13,-18,10,9,9,-25,-17,-13;  
 MA /M: SY='D'; M=-11,14,-25,16,14,-19,-16,1,-21,-1,-18,-  
 15,10,-12,3,-4,2,-2,-20,-30,-12,8;  
 MA /M: SY='L'; M=-10,-24,-23,-26,-16,2,-30,-17,15,-  
 16,28,14,-23,-25,-13,-13,-23,-9,8,-18,2,-15;  
 MA /M: SY='L'; M=-10,-29,-20,-30,-20,12,-29,-17,19,-  
 27,44,24,-28,-29,-18,-19,-28,-10,10,-19,1,-19;  
 MA /M: SY='V'; M=-4,-16,-20,-17,-18,-8,-27,-19,15,-16,3,4,-  
 17,-16,-18,-18,-9,-1,20,-28,-9,-19;  
 MA /M: SY='S'; M=1,2,-20,-1,7,-22,-10,-9,-17,2,-20,-12,5,-  
 10,6,-3,10,7,-14,-29,-15,6;  
 MA /M: SY='H'; M=-13,-6,-24,-9,-7,-1,-21,29,-15,-6,-13,-  
 4,0,-21,0,-1,-4,-4,-15,-14,20,-6;  
 MA /M: SY='Y'; M=-13,-20,-12,-24,-21,31,-26,2,-5,-16,-2,-  
 4,-17,-28,-18,-15,-12,-7,-7,10,45,-21;  
 MA /M: SY='G'; M=-6,-7,-21,-4,-5,-22,11,-15,-24,-14,-18,-  
 15,-6,1,-12,-16,-3,-7,-21,-26,-20,-9;  
 MA /M: SY='E'; M=1,-1,-25,3,18,-27,5,-10,-28,-1,-24,-19,-  
 1,0,2,-8,7,-6,-23,-28,-22,9;  
 MA /I: I=-6; MD=-32;  
 MA /M: SY='E'; M=-8,2,-25,2,10,-21,-7,-3,-21,7,-20,-12,3,-  
 13,7,4,0,-6,-19,-21,-7,8; D=-6;  
 MA /I: I=-6; MI=-32; IM=-32; DM=-32;  
 MA /M: SY='Y'; M=-15,-8,-32,-5,0,-8,-21,0,-17,1,-14,-10,-  
 10,-15,5,2,-12,-11,-20,12,17,1;  
 MA /M: SY='A'; M=37,-13,-14,-21,-14,-18,2,-21,-5,-13,-8,-  
 7,-11,-13,-13,-21,5,-3,2,-20,-19,-14;  
 MA /M: SY='W'; M=-8,-30,-31,-30,-22,1,-18,-25,-4,-17,-4,-  
 7,-29,-27,-19,-15,-23,-16,-2,51,7,-19;  
 MA /M: SY='E'; M=-8,10,-24,12,14,-24,-13,-2,-21,7,-19,-  
 8,7,-11,8,4,2,-5,-19,-30,-15,11;  
 MA /M: SY='V'; M=2,-23,-15,-26,-20,-2,-24,-21,15,-  
 16,17,12,-23,-24,-18,-16,-12,0,20,-24,-7,-19;  
 MA /M: SY='T'; M=10,-7,-11,-14,-12,-11,-16,-20,-4,-12,-6,-  
 7,-6,-14,-12,-14,14,28,6,-29,-12,-12;  
 MA /M: SY='L'; M=-7,-26,-19,-30,-22,11,-28,-20,18,-  
 23,23,15,-23,-26,-20,-16,-18,-7,15,-19,0,-21;  
 MA /M: SY='N'; M=-6,7,-24,4,6,-26,-8,2,-24,8,-24,-13,12,-  
 13,11,8,6,-1,-22,-28,-14,8;  
 MA /M: SY='I'; M=-5,-25,-21,-31,-27,-2,-29,-28,31,-  
 24,12,11,-20,-22,-22,-24,-11,0,29,-24,-6,-27;

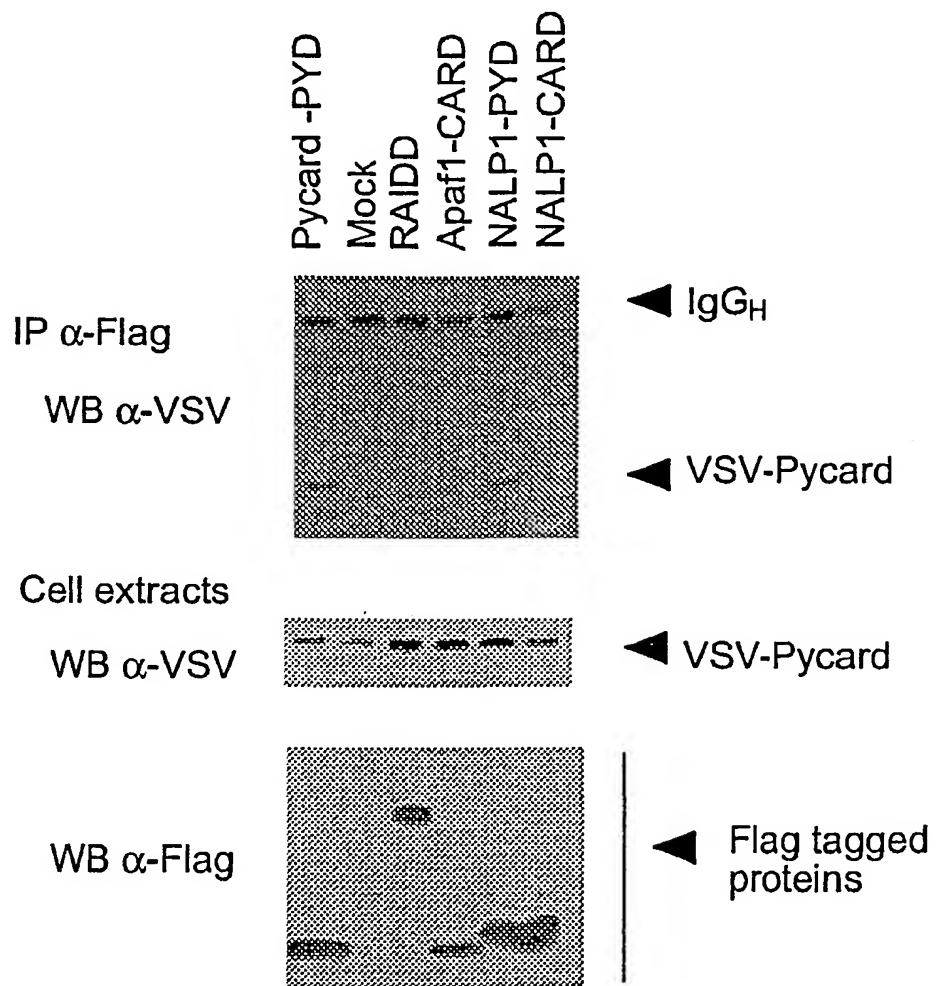
Fig. 3/3

```

MA    /M: SY='F'; M=-16,-30,-21,-36,-26,47,-30,-20,8,-
30,26,8,-25,-30,-31,-20,-25,-11,3,4,17,-25;
MA    /M: SY='R'; M=-8,-2,-27,0,18,-26,-15,-2,-25,15,-19,-11,-
1,-11,18,22,-2,-8,-22,-24,-14,16;
MA    /M: SY='K'; M=-4,2,-24,1,2,-23,-13,-8,-16,8,-15,-4,0,-
14,4,4,-4,-5,-12,-25,-13,2;
MA    /M: SY='M'; M=-7,-22,-21,-31,-21,-1,-24,-10,24,-
16,19,43,-19,-20,-7,-16,-18,-7,14,-20,-1,-15;
MA    /M: SY='N'; M=-10,21,-25,11,-2,-24,9,5,-27,3,-29,-
18,34,-19,-2,5,3,-7,-28,-32,-18,-3;
MA    /M: SY='L'; M=-10,-18,-5,-21,-12,-8,-25,-12,-5,-6,6,3,-
15,-25,-5,5,-16,-10,-5,-22,-5,-10;
MA    /M: SY='R'; M=-11,2,-24,-1,3,-19,-18,-3,-17,10,-13,-
3,5,-15,8,15,-3,0,-15,-26,-11,4;
MA    /M: SY='D'; M=-5,12,-24,18,16,-26,-15,-2,-22,-1,-16,-
15,3,-11,4,-7,2,-4,-17,-31,-15,10;
MA    /M: SY='L'; M=-9,-28,-19,-29,-19,6,-29,-19,21,-
26,39,21,-28,-28,-18,-19,-25,-9,15,-22,-2,-19;
MA    /M: SY='C'; M=16,-15,25,-22,-17,-16,-13,-22,-15,-17,-
15,-12,-13,-21,-16,-21,3,-1,-4,-19,-18,-16;
MA    /M: SY='E'; M=-2,6,-25,10,25,-26,-10,-7,-25,7,-20,-
16,1,-8,6,1,0,-7,-20,-28,-18,15;
MA    /M: SY='R'; M=-13,-2,-29,-1,12,-27,-20,-1,-23,21,-19,-
6,-2,-13,20,28,-6,-9,-19,-23,-11,15;
MA    /M: SY='L'; M=13,-22,-16,-26,-18,-4,-16,-22,9,-21,19,6,-
21,-22,-17,-21,-12,-6,10,-21,-10,-18;
MA    /M: SY='Q'; M=-11,-4,-27,-4,5,-25,-18,2,-17,8,-14,-3,-
2,-15,21,14,-5,-7,-18,-23,-8,11;
MA    /M: SY='E'; M=-5,3,-27,6,17,-26,-8,-2,-29,11,-21,-15,1,-
11,6,13,-2,-9,-22,-25,-16,11;
MA    /M: SY='E'; M=-5,5,-27,6,22,-24,-13,-1,-20,2,-17,-13,4,-
9,6,1,-1,-8,-19,-28,-15,13;
MA    /M: SY='M'; M=-2,-17,-6,-25,-18,-9,-23,-16,6,-10,2,14,-
14,-20,-9,-7,-8,0,7,-25,-9,-15;
MA    /M: SY='N'; M=-3,1,-22,-4,1,-16,-15,-7,-10,3,-8,-3,5,-
17,-2,2,-5,-6,-9,-27,-13,0;
MA    /M: SY='H'; M=-6,1,-28,3,21,-26,-11,24,-28,2,-20,-11,2,-
11,15,4,-3,-12,-26,-26,-8,16;
MA    /M: SY='S'; M=-3,-1,-19,-4,-7,-18,-1,3,-17,-6,-21,-
12,9,-18,-5,-1,10,0,-9,-32,-14,-7;
MA    /M: SY='V'; M=-4,-21,-18,-23,-22,6,-2,-22,0,-22,1,-2,-
16,-25,-24,-19,-6,-5,9,-20,-8,-22;
MA    /I: E1=0; IE=-105; DE=-105;
CC    /GENERATED_BY="/usr/molbio/bin/pfmake -2b -
/usr/molbio/share/pftools/blosum45.cmp H=0.6";
//

```

Fig. 4





NAGGAWGRLACVLEFLKKEELKEFQLLANKAHSRSSGETPAQPHKTSMEVASYLVAQYGEQORANDLA  
 DEFWQMGIRSHCAQAEAGHSPSPFPSPPEHLGSPSQPTSTAVLMPWIHELPACTQGSERRVLRQL  
 PDTSGRRWREISASLLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTSTAVLSWGSPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDE  
 TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPQAHTSLQPHHPWEPSPVRESLCSWPKNEDFNQKFTQ  
 LLLLQRPHPRSQDPLVKRSWPDYVEENRGHLIEIRDI FGPGLDQEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEA  
 WGRGQLYGDRFQHVFFYFSCRELAQSKVVSLAELIGKDGATATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQ  
 EPSSELCLHWSQPQPADALLGSLGKTLILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRKEYF  
 YRYFTDERQAIRAFRLVKSNNELWALCLVPWVSWLACTCLMQMKRKEKLTLSKTTTTLCLHYLAQALQ  
 AQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKTLFSPDDLKRGHLDGAIISTFLKMGILOEHPPLSYSPFIHLCFQEFF  
 AAMSYYLEDEKGRGKHSNCI IDLEKTEAYGIHGLFGASTTRFLGLLSDEGEREMENIFHCRLSQGRNL  
 MQWVPSLQLLLQPHSLESLSHCLYETRNTFTLQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQLI  
 EGRQHRSTWSPMTVVLFRRVPTDAYWQILFVSVLKVTRNLKELDLGNSLSHSAVKSLSCKTLRRPRCLLE  
 TIRLAGCGLTAECDCKDLAFGLRANQTLTELDLSFNVLTDAGAKHLQRLRQPSCKLQRLQVSCGLTSDC  
 CQDLASVLSASPILKELDLQONNLDVGVRLCEGLRHPACKLIRGLDQTTLSDEMROELRALEQEKPO  
 LLIFSRRRKPSVMTPTTEGLDTGEMSNSTSSILKRQRLGSERAASHVAQANLKLLDVSKIFFPIAEIAEESPE  
 VVPVELLCVPSPASQGLHTKPLGTDDDFWGPPTGPVATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVMR  
 EAVTVEIEFCVWDQFLGEINPQHSWMVAGPLDDIKAEPGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSLFQMAHFKEE  
 GMLLEKPARVELHHIIVLENPSFSPGLVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRVHPEEVTFLYLIPSDCSIR  
 KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLSGIRLQVKDKDETLVWEALVKPGDIMPATTLIPPARIAVPSPLD  
 APQLLHFVDQYREQLLIARVTSVEWVLDKHLHGQVLSQEQYERVLAEINTRPSQMRKLFSLSQSWDRKCKDGL  
 YQALKKETHPHLIMEL EKGSKKGLPLSS

Forts. Fig. 5

<b>PYD</b>	Pycard Pytin	HS HS	<p>12: L ENL PA EE K K F K L K M L S . . . . . V P I R E . G Y G R I P S G A L S M A I D L . . . . . T D K M S F L E T Y G A L T . A . N I R D G L Q E M A G O L Q A A T</p> <p>13: L E E L P Y D F E K F K L J O N . . . . . T S I Q K . E H S R I P S Q I Q R A R P K M . . . . . A T L E T Y G E E Y A V Q L T . L . Q M R A N Q R L L A E E L H R A A</p>
<b>DED</b>	Caspase8 FADD PEA-15	HS HS HS	<p>1: M D . . F S R N Y D G E Q I D S . . . . . E D J A S L K F S L D Y P Q R Q E P K D . . . . . A L M I F Q R L Q E K R M L E S N L . S F K E I L F R I N R L D L L I T Y</p> <p>1: M D D P F L V L H S S S S S S . . . . . S E I T E L K F C I G E U G K R L R Q S . . . . . G L D F S M L L E Q N D L P G H T . E M R E I L L A S L R R H D L L R R Y</p> <p>1: M V E . Y G T I F Q D E T N N T L . . . . . E D J E Q L K S A C K E D P S E S E T T . . . . . G S A W F S F L E S H N K L K D N L . S T E H F F E I S R R P D L L T M V</p>
<b>CARD</b>	APAF-1 CED-3 CED-4	HS CE CE	<p>5: A R N C F L Q H R E A E K D E K T S Y I M D H M I S D G F T I S E E K K V N N P T Q Q . . . . . R A A M P K M I L K K D . . . . . N D S Y V . S F Y N A L H E G Y K . D J A A L F</p> <p>5: R R S L E R N E M M F S S H K V D E I L E V I A K Q V L N S D N G M N S C G T V R E . . . . . K R R E M K A V Q R R G . . . . . V A F D . A F Y D A R S T G H E . G L A E V F</p> <p>6: E C R A S T A H T R I H D F E P R D A L T Y E G K N I F T E D S L S K M S T R L E . . . . . R I A N F R I R R R Q A S . . . . . P M D F F N Y N N Q S . H E A D F F</p>
<b>DED</b>	FAS FADD RIP	HS HS HS	<p>204: S D V D S K Y T T T I A G V M T L S . Q V K G F V R K N G V N E A L I E E K N I N I N I Q D T A . E Q K V Q L R N H Q L H G K K E A Y D . T M K D P K K A N I C . T L A E K F</p> <p>93: G E E D C A A F N V C D N I G K D . . . . . W R R J A R Q L K S D T K S S E D R Y P R N I T . E R V R E S R I R I K N T E K E N A T V A . H N G A R S C Q M N . I M A D L F</p> <p>579: T T S L T D K H J D P R E N I G K H . . . . . W K N C A R K L G F T Q S Q I D E S D H I Y E R D G L K E K V Y Q L Q K V M R E G I K G A T V G K I A Q A P H Q C S R I D L F S S L F</p>

Fig. 6

## The PYD Domain

Pyrin.hs	LEQLVPY	.FEKFKFKLQNTS	.QKEHSRIPRSQ	QM.	ARP	KLA	AT	LL	TY	GE	EY	AV	Q	T	Q	LRA	NQRL	LA	E	HR
Pyrin.mm	LELLPY	.FEKFKFKLQNTSL	.EKGHSKIPRGH	QM.	ARP	KLA	AT	LL	TY	GE	EY	AV	Q	T	Q	LRA	NQRL	LA	E	HR
Pyrin.rn	LELLPYE	.LEKFKFKLHTTSL	.EKGHSRIPLSL	KM.	ARP	KLTR	LL	TY	GE	EY	AV	Q	T	Q	LRA	NQRL	LA	E	HR	
Pycard.hs	LENLPAE	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	LS.	MDA	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
Pycard.mm	LENLSP	E.LKFKMLLTVQL	.REGYGRIPRGA	LQ.	MDA	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
Pyc.hs	LENLTP	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	GQ.	LDI	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP1.hs	LEFLKK	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP2/Py7.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP3/Py5.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP4/Py6.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP5/Py8.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP6/Py9.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP7/Py11.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP8/Py12.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP9/Py13.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP10/Py14.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP11/Py15.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP12/Py20.mm	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP13/Py17.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP14/Py18.mm	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
NALP15/Py19.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
Py10.hs	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
Py16.mm	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
Casp1.ze	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
Casp2.ze	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
Pycard.ze	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	
consensus	LEQLSQ	E.LKFKMLLTVPL	.REGYGRIPRGA	Q.	TSG	DL	TD	KL	SY	LE	SY	AE	TAN	LR	DM	GLQ	LA	Q	QA	

Fig. 7

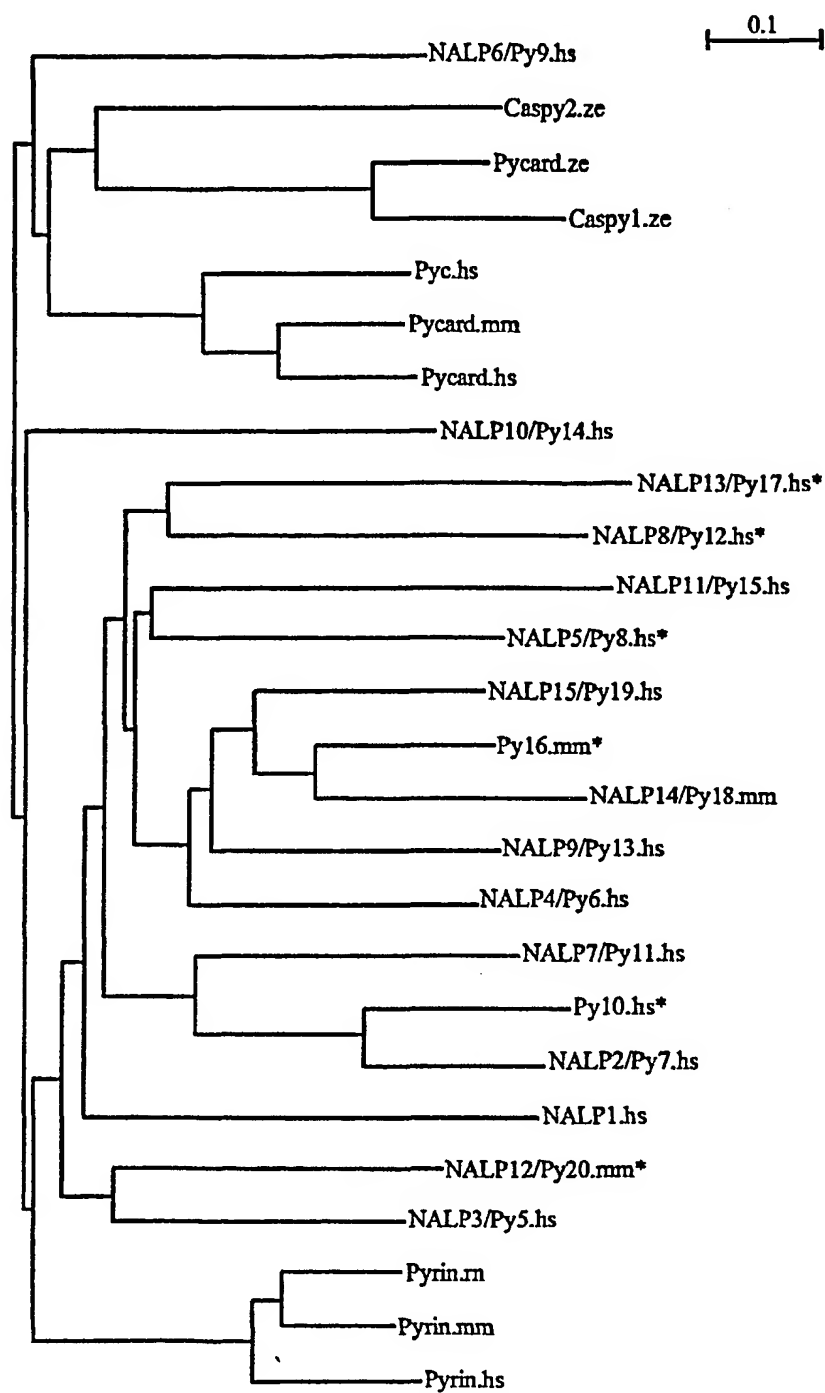


Fig. 8

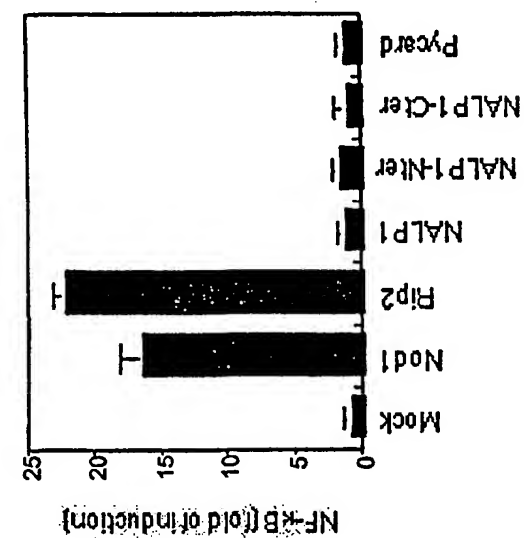
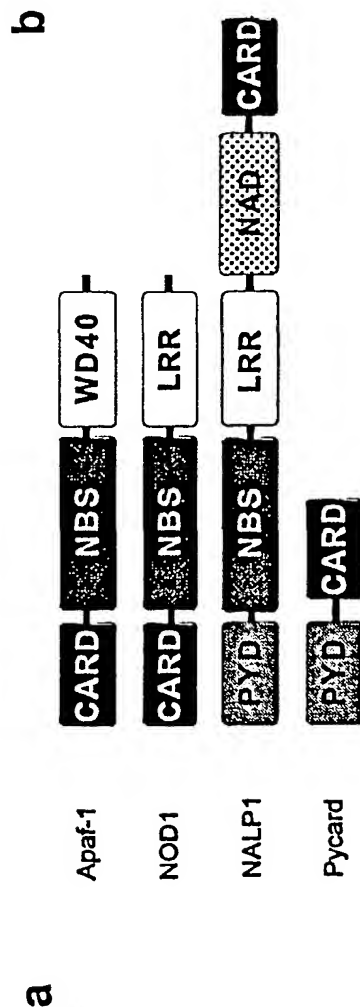
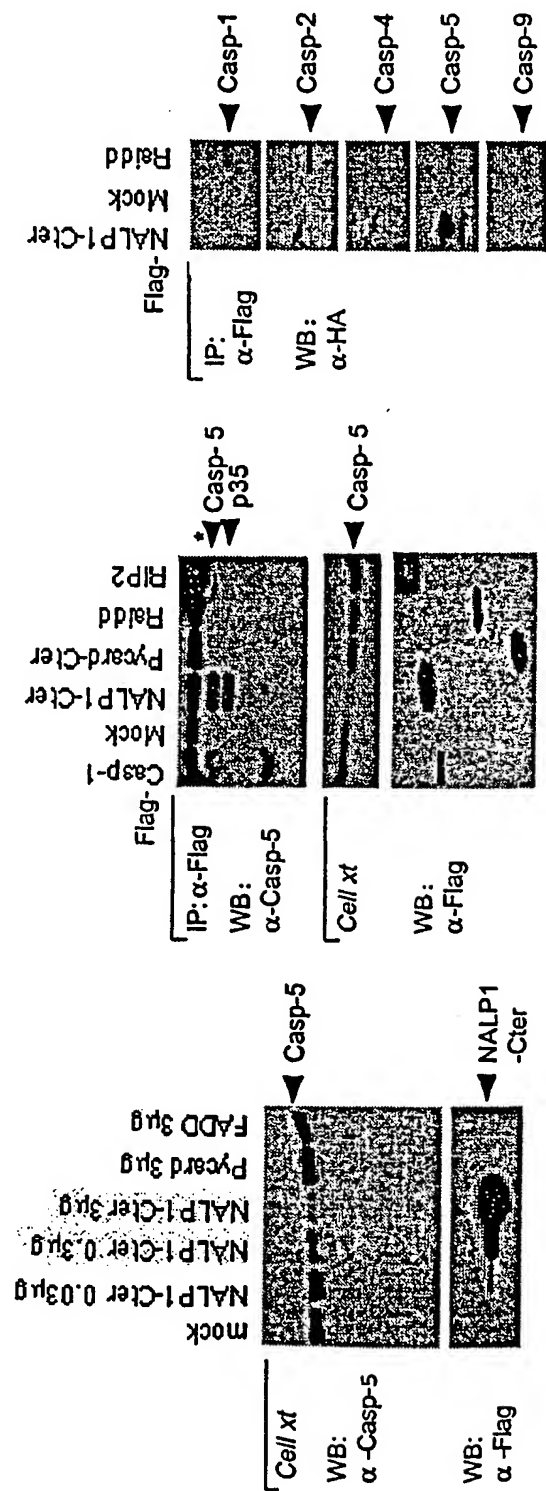
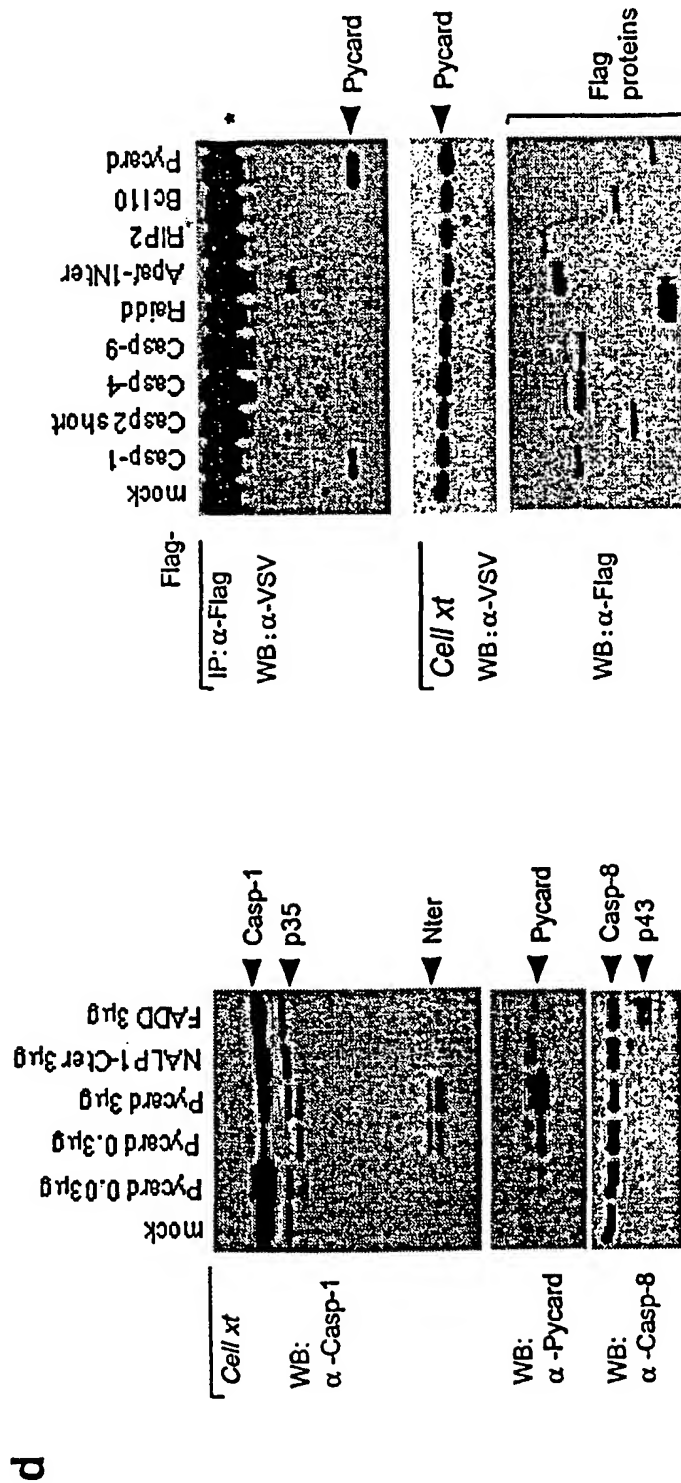


Fig. 9





Forts. Fig. 9



Forsts. Fig. 9

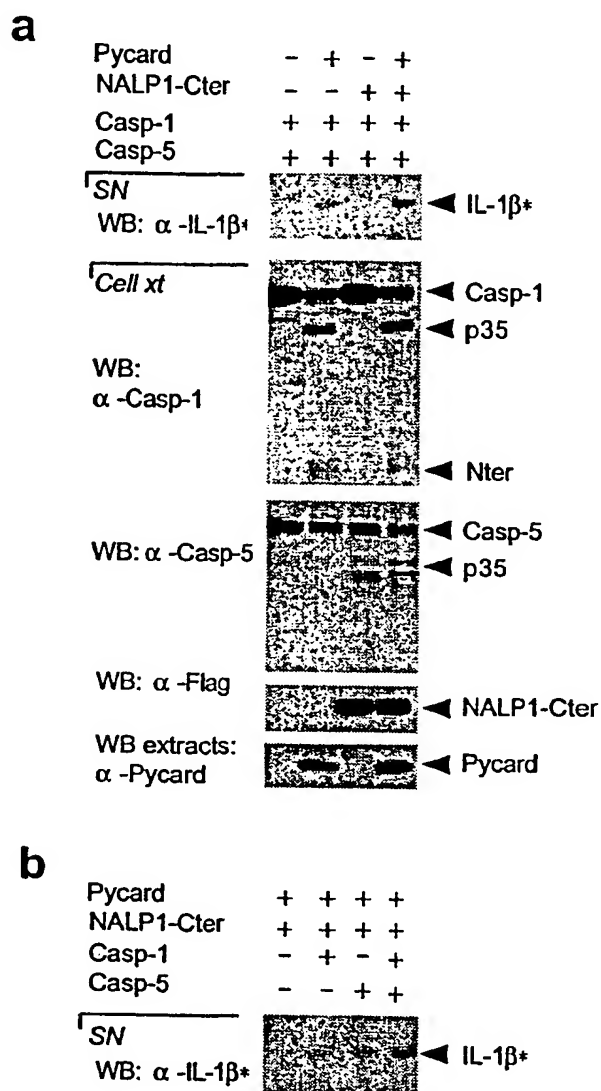


Fig. 10

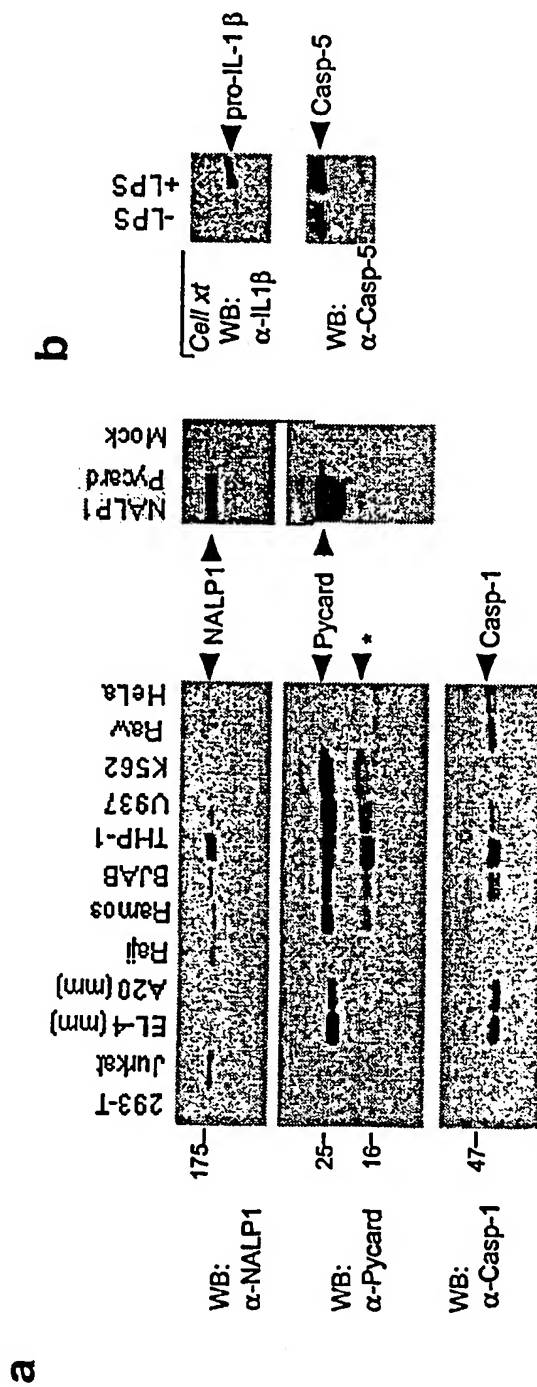
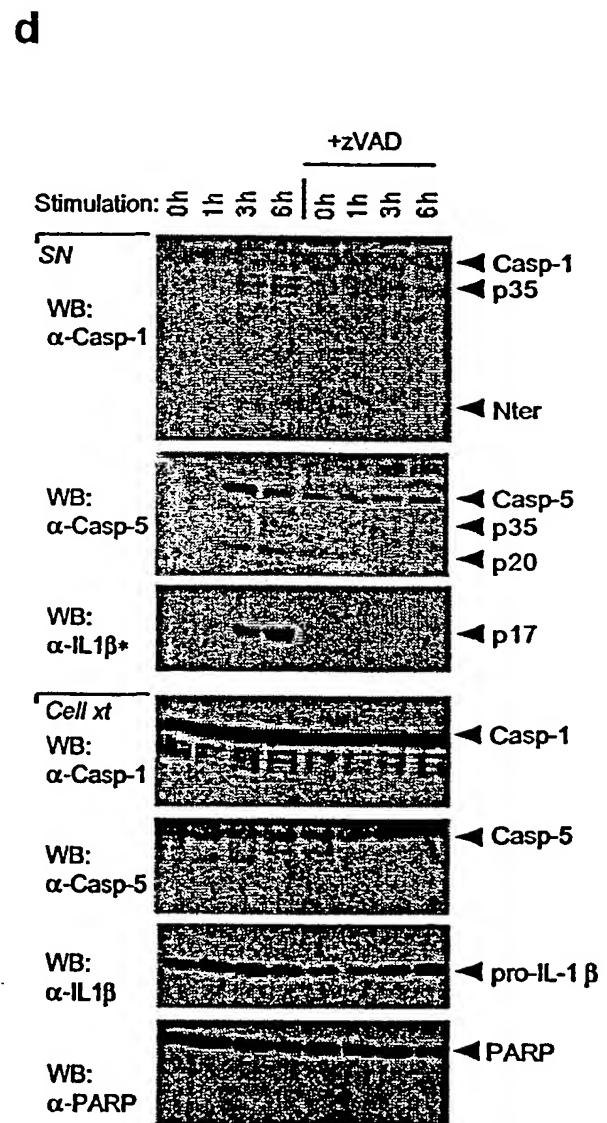
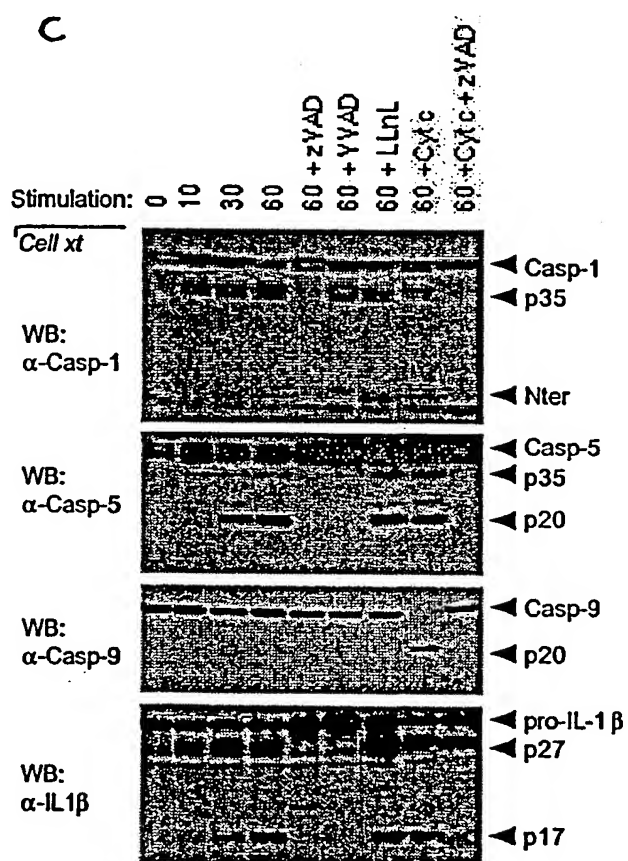


Fig. 11



Forts. Fig. 11

a

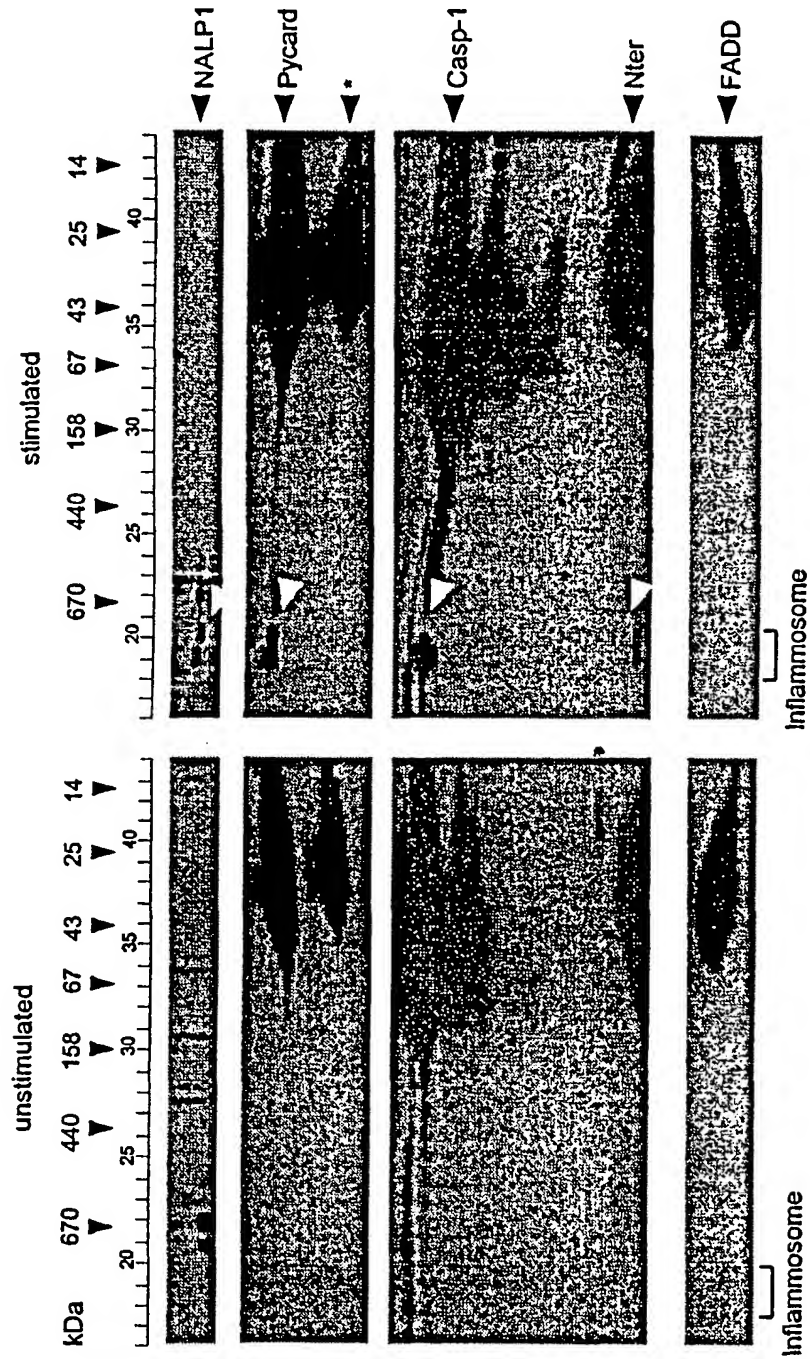
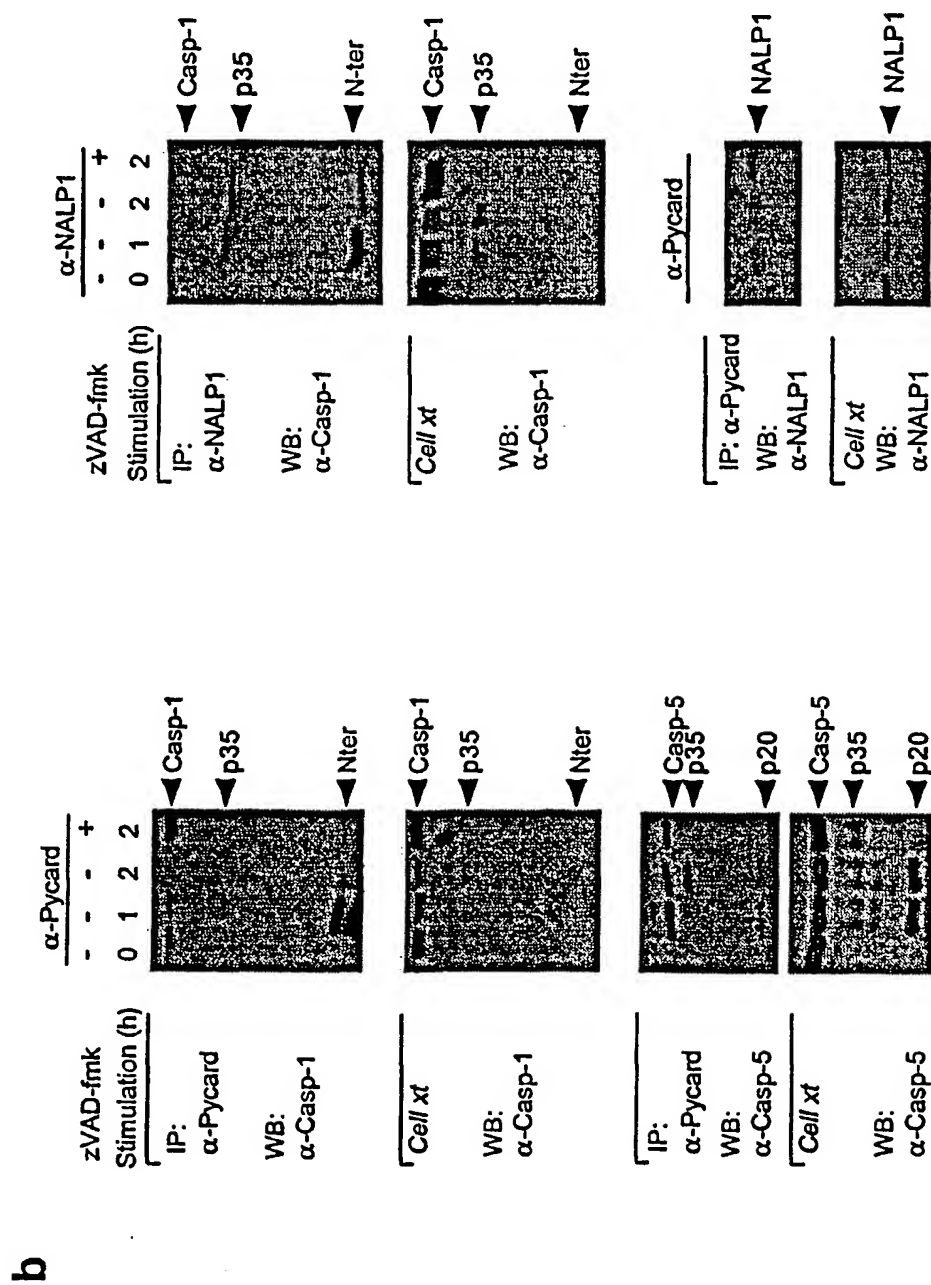
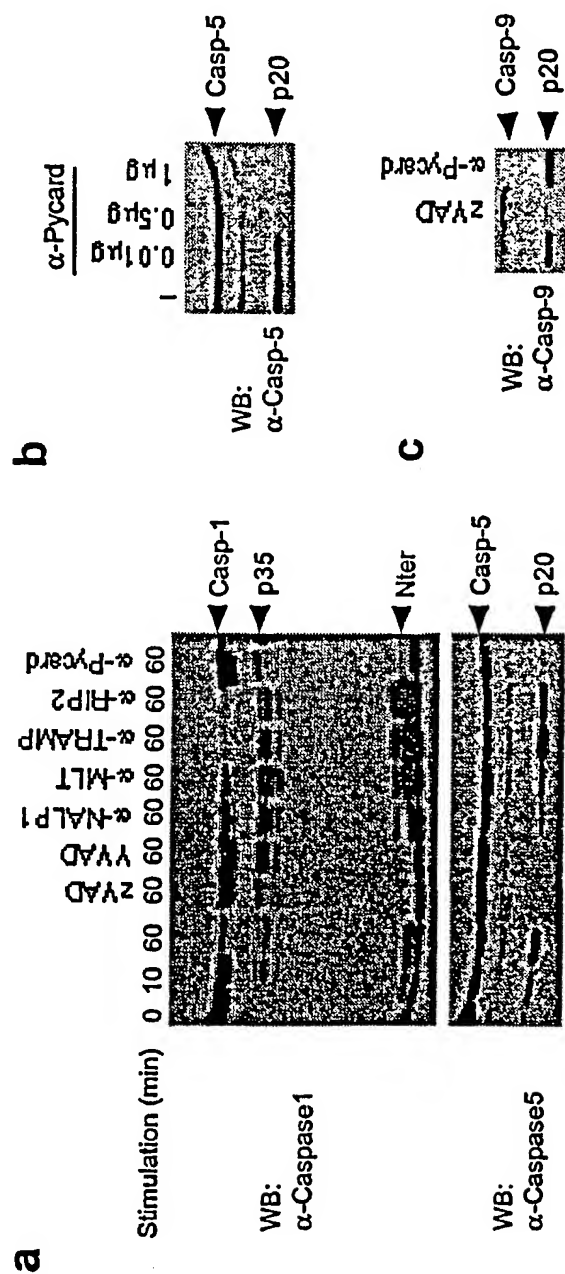


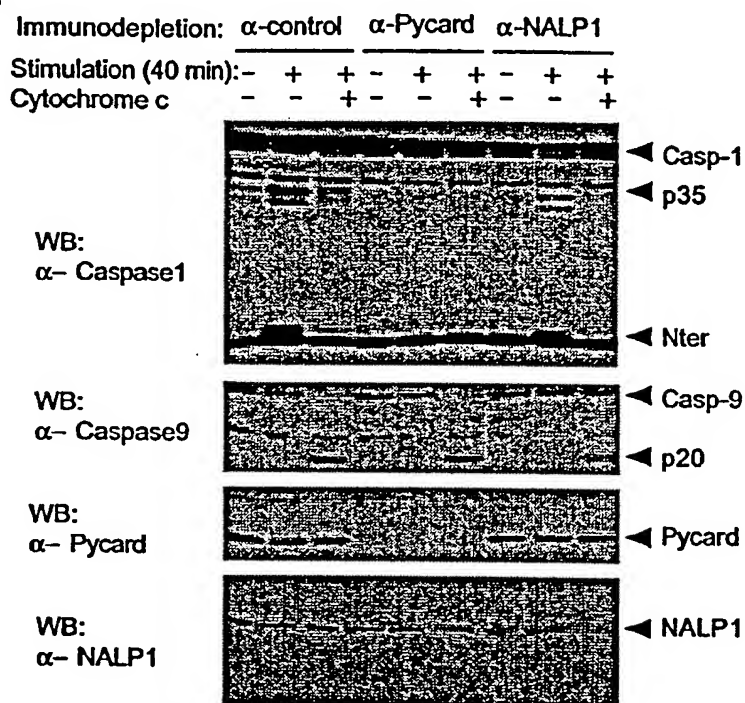
Fig. 12



Forts. Fig. 12



Forts. Fig. 13

**d**

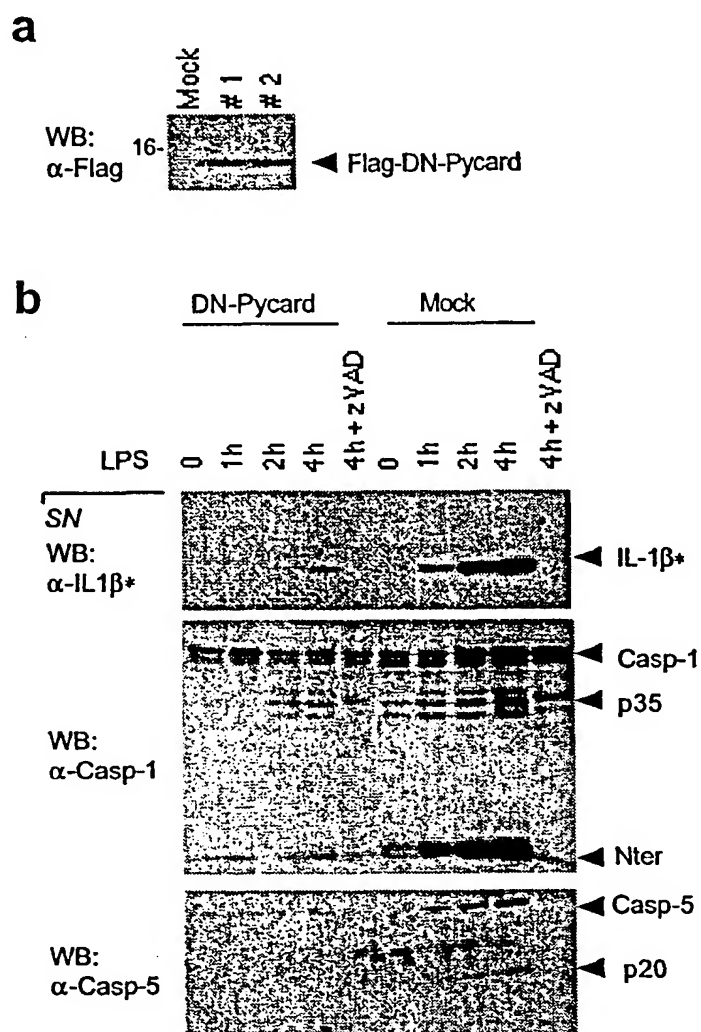


Fig. 14

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/040668 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/12.  
C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17

(72) Erfinder; und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TSCHOPP, Jürg  
[CH/CH]; 10. ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges  
(CH). MARTINON, Fabio [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004  
Lausanne (CH).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Oktober 2001 (30.10.2001)

(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch,  
Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München  
(DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE  
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): APOXIS SA [CH/CH]; 22, chemin des Croisettes,  
CH-1066 Epalinges (CH).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

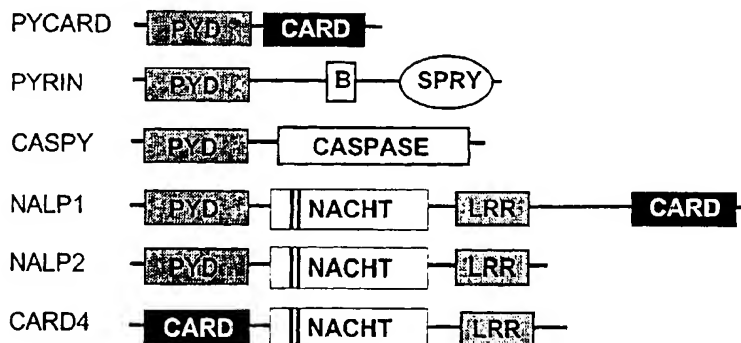
(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMA-  
TIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI  
ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

A

```
Pycard HS 12: L E L P A S E L K F K L L S V P L R E G Y G R I P G A L L S D A V D L D K L V S Y L E T A E L T A V L R G L S A G Q L Q A N T : 89
Pyrin HS 13: L E L V P Y P E K F K F L Q N T S L C E H S R I P S O L C A L P K K A T L L V Y Y G E A V O L T L V L R N Q R L A E R H R A : 90
NALP1 HS 13: L E L K K S E L E F Q L L N K A H S R S S O R T P A Q P E R T S O . . . H S Y L V A Q Y G E A W D L A H T W E Q G L R S C A Q A Q A : 90
NALP2 HS 13: L E L S Q D E L S E F Y L T T F S L A E L Q L P K E L A D G K O L V L T H C D S Y V E M A S L V F E K H R M D L E R A K E V : 90
CaspY DR 13: L S E C A D L K F O S L I D . . . R Q E P R R S M I S E N D E I D L D L L V N T T S D A V S T N D L E C C A V A B E L L N G : 87
Pycard DR 13: F E D L C A D L K F K S R L D . . . R Q E P R T G A L K N D E I D L A D L V G V T S K D A V S T E L R A C A V A B E L L R M : 88
consensus 1: *****|*****:80
```

B



(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/040668 A3



**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TL, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:**

3. Juli 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen*

**Veröffentlicht:**

*mit internationalem Recherchenbericht*

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/12545

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K48/00 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASUMOTO J ET AL: "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 274, no. 48, 26 November 1999 (1999-11-26), pages 33835-33838, XP002191744 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-19
Y	& DATABASE EMBL [Online] 1 December 1999 (1999-12-01) retrieved from EBI Database accession no. AB023416 abstract --- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 2002

Date of mailing of the international search report

16. 01. 03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, B

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE EMBL [Online]  3 September 1998 (1998-09-03)  retrieved from EBI  Database accession no. AF086332  XP002213126  abstract</p>	1-19
A	<p>---  INOHARA N ET AL: "Genes with homology to  mammalian apoptosis regulators identified  in zebrafish."  CELL DEATH AND DIFFERENTIATION. ENGLAND  MAY 2000,  vol. 7, no. 5, May 2000 (2000-05), pages  509-510, XP002213121  ISSN: 1350-9047  the whole document</p>	1-19
A	<p>---  DATABASE EPOP [Online]  5 September 2000 (2000-09-05)  retrieved from EBI  Database accession no. AX017324  XP002213127  abstract  &amp; WO 99 47669 A (SCHMITT ARMIN ET AL.)  23 September 1999 (1999-09-23)</p>	1-19
A	<p>---  HOFMANN K: "The modular nature of  apoptotic signaling proteins"  CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES,  BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH,  vol. 55, July 1999 (1999-07), pages  1113-1128, XP002171651  ISSN: 1420-682X  the whole document</p>	1-19
P,X	<p>---  DATABASE GSP [Online]  9 March 2001 (2001-03-09)  retrieved from EBI  Database accession no. AAB36608  XP002213128  abstract</p>	1-19
E	<p>&amp; WO 00 70047 A (INCYTE GENOMICS INC.)  23 November 2000 (2000-11-23)</p>	1-19
P,X	<p>---  PAWLOWSKI K ET AL: "PAAD - a new protein  domain associated with apoptosis, cancer  and autoimmune diseases."  TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND  FEB 2001,  vol. 26, no. 2, February 2001 (2001-02),  pages 85-87, XP002213122  ISSN: 0968-0004  the whole document  figure 1</p> <p>---  -/--</p>	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 01/12545

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	MASUMOTO J ET AL: "Pyrin N-terminal homology domain- and caspase recruitment domain-dependent oligomerization of ASC." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. UNITED STATES 26 JAN 2001, vol. 280, no. 3, 26 January 2001 (2001-01-26), pages 652-655, XP002213123 ISSN: 0006-291X the whole document	1-19
P,A	--- BERTIN J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A NOVEL MOTIF FOUND IN APOPTOSIS AND INFLAMMATION PROTEINS" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, EDWARD ARNOLD, OXFORD, GB, vol. 12, no. 7, December 2000 (2000-12), pages 1273-1274, XP008006072 ISSN: 1350-9047 the whole document	1-19
P,A	--- FAIRBROTHER W J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A MEMBER OF THE DEATH DOMAIN-FOLD SUPERFAMILY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 9, no. 10, September 2001 (2001-09), pages 1911-1918, XP008006069 ISSN: 0961-8368 the whole document	1-19
P,A	--- STAUB E ET AL: "The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins." TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND FEB 2001, vol. 26, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 83-85, XP002213124 ISSN: 0968-0004 the whole document	1-19
P,A	--- MARTINON F ET AL: "The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation." CURRENT BIOLOGY: CB. ENGLAND 20 FEB 2001, vol. 11, no. 4, 20 February 2001 (2001-02-20), pages R118-R120, XP002213125 ISSN: 0960-9822 the whole document -----	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/12545

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
**Although Claims 17-19 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.**
2. ☒ Claims Nos.: 20-23  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**See additional sheet PCT/ISA/210**
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

X

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Claims 1-19 (partly)**

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of I.2

Claims: 20-23

Claims 20-23 are directed to compounds that block the specific interaction of PYD domains for intracellular signal transduction, and to medical use thereof. A search appears possible for want of any indication of sufficient structural features of such a compound.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## 1. Claims: Invention 1: Claims 1-19 (in part)

DNA sequence coding for human PYC protein (SEQ ID NO: 2), expression vectors, host cells, gene product (SEQ ID NO: 1), antibodies, method of isolating the gene product, method of expressing the gene product, medical use of the DNA sequence or of the gene product.

## 2. Claims: Invention 2: Claims 1-19 (in part)

DNA sequence coding for human pyrin protein (SEQ ID NO: 4), expression vectors, host cells, gene product (SEQ ID NO: 3), antibodies, method of isolating the gene product, method of expressing the gene product, medical use of the DNA sequence or of the gene product.

## 3. Claims: Invention 3: Claims 1-19 (in part)

DNA sequence coding for human PYCARD protein (SEQ ID NO: 6), expression vectors, host cells, gene product (SEQ ID NO: 5), antibodies, method of isolating the gene product, method of expressing the gene product, medical use of the DNA sequence or of the gene product.

## 4. Claims: Inventions 4-20: Claims 1-19 (in part)

analogously for DNA sequences with SEQ ID NO: 8, 10, 12, ..., 38, 40.

## 5. Claims: Invention 21: Claims 11-14 and 17-19 (in part)

gene product containing an amino acid sequence for a PYD domain from the mouse pyrin protein (SEQ ID NO: 60, pycard.mm), antibodies, medical use of the gene product.

## 6. Claims: Invention 21: Claims 11-14 and 17-19 (in part)

gene product containing an amino acid sequence for a PYD domain from the mouse pyrin protein (SEQ ID NO: 60, pycard.mm), antibodies, medical use of the gene product.

## 7. Claims: Inventions 23-26: Claims 11-14 and 17-19 (in part)

analogously for gene products with SEQ ID NO: 63, 82, 83, 84.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/12545

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9947669 A	23-09-1999	DE 19813839 A	23-09-1999
		EP 1236799 A	04-09-2002
		EP 1064379 A	03-01-2001
		JP 2002506643 T	05-03-2002
-----			
WO 0070047 A	23-11-2000	AU 5134600 A	05-12-2000
		EP 1179065 A	13-02-2002
		US 2002076762 A	20-06-2002
-----			

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K48/00 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen:

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MASUMOTO J ET AL: "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 274, Nr. 48, 26. November 1999 (1999-11-26), Seiten 33835-33838, XP002191744 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-19
Y	& DATABASE EMBL 'Online! 1. Dezember 1999 (1999-12-01) retrieved from EBI Database accession no. AB023416 Zusammenfassung --- -/--	1-19



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. September 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16. 01. 03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rutz, B

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
Y	<p>DATABASE EMBL 'Online!  3. September 1998 (1998-09-03)  retrieved from EBI  Database accession no. AF086332  XP002213126  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1-19
A	<p>INOHARA N ET AL: "Genes with homology to  mammalian apoptosis regulators identified  in zebrafish."  CELL DEATH AND DIFFERENTIATION. ENGLAND  MAY 2000,  Bd. 7, Nr. 5, Mai 2000 (2000-05), Seiten  509-510, XP002213121  ISSN: 1350-9047  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-19
A	<p>DATABASE EPOP 'Online!  5. September 2000 (2000-09-05)  retrieved from EBI  Database accession no. AX017324  XP002213127  Zusammenfassung  &amp; WO 99 47669 A (SCHMITT ARMIN ET AL.)  23. September 1999 (1999-09-23)</p> <p>---</p>	1-19
A	<p>HOFMANN K: "The modular nature of  apoptotic signaling proteins"  CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES,  BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH,  Bd. 55, Juli 1999 (1999-07), Seiten  1113-1128, XP002171651  ISSN: 1420-682X  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-19
P,X	<p>DATABASE GSP 'Online!  9. März 2001 (2001-03-09)  retrieved from EBI  Database accession no. AAB36608  XP002213128  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1-19
E	<p>&amp; WO 00 70047 A (INCYTE GENOMICS INC.)  23. November 2000 (2000-11-23)</p> <p>---</p>	1-19
P,X	<p>PAWLOWSKI K ET AL: "PAAD - a new protein  domain associated with apoptosis, cancer  and autoimmune diseases."  TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND  FEB 2001,  Bd. 26, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02),  Seiten 85-87, XP002213122  ISSN: 0968-0004  das ganze Dokument  Abbildung 1</p> <p>---</p>	1-19
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	MASUMOTO J ET AL: "Pyrin N-terminal homology domain- and caspase recruitment domain-dependent oligomerization of ASC." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. UNITED STATES 26 JAN 2001, Bd. 280, Nr. 3, 26. Januar 2001 (2001-01-26), Seiten 652-655, XP002213123 ISSN: 0006-291X das ganze Dokument ---	1-19
P,A	BERTIN J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A NOVEL MOTIF FOUND IN APOPTOSIS AND INFLAMMATION PROTEINS" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, EDWARD ARNOLD, OXFORD, GB, Bd. 12, Nr. 7, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 1273-1274, XP008006072 ISSN: 1350-9047 das ganze Dokument ---	1-19
P,A	FAIRBROTHER W J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A MEMBER OF THE DEATH DOMAIN-FOLD SUPERFAMILY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 9, Nr. 10, September 2001 (2001-09), Seiten 1911-1918, XP008006069 ISSN: 0961-8368 das ganze Dokument ---	1-19
P,A	STAUB E ET AL: "The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins." TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND FEB 2001, Bd. 26, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 83-85, XP002213124 ISSN: 0968-0004 das ganze Dokument ---	1-19
P,A	MARTINON F ET AL: "The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation." CURRENT BIOLOGY: CB. ENGLAND 20 FEB 2001, Bd. 11, Nr. 4, 20. Februar 2001 (2001-02-20), Seiten R118-R120, XP002213125 ISSN: 0960-9822 das ganze Dokument -----	1-19

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl die Ansprüche 17-19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 20-23  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
Ansprüche 1-19 (teilweise)

## Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 20-23

Ansprüche 20-23 sind auf Verbindungen gerichtet, die die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung blockieren bzw. auf deren medizinische Verwendung. Da keine ausreichenden strukturellen Merkmale solcher Verbindung angegeben wurden, erscheint eine Recherche nicht möglich.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

## WEITERE ANGABEN

PCT/SA/ 210

## 1. Ansprüche: Erfindung 1: Ansprüche 1-19 (teilweise)

DNA-Sequenz kodierend für menschliches Pyc Protein (SEQ ID NO: 2), Expressionsvektoren, Wirtszellen, Genprodukt (SEQ ID NO: 1), Antikörper, Verfahren zur Isolierung des Genprodukts, Verfahren zur Expression des Genprodukts, medizinische Verwendung der DNA-Sequenz oder des Genprodukts

## 2. Ansprüche: Erfindung 2: Ansprüche 1-19 (teilweise)

DNA-Sequenz kodierend für menschliches Pyrin Protein (SEQ ID NO: 4), Expressionsvektoren, Wirtszellen, Genprodukt (SEQ ID NO: 3), Antikörper, Verfahren zur Isolierung des Genprodukts, Verfahren zur Expression des Genprodukts, medizinische Verwendung der DNA-Sequenz oder des Genprodukts

## 3. Ansprüche: Erfindung 3: Ansprüche 1-19 (teilweise)

DNA-Sequenz kodierend für menschliches Pycard Protein (SEQ ID NO: 6), Expressionsvektoren, Wirtszellen, Genprodukt (SEQ ID NO: 5), Antikörper, Verfahren zur Isolierung des Genprodukts, Verfahren zur Expression des Genprodukts, medizinische Verwendung der DNA-Sequenz oder des Genprodukts

## 4. Ansprüche: Erfindungen 4-20: Ansprüche 1-19 (teilweise)

analog für DNA-Sequenzen mit SEQ ID NO: 8, 10, 12,... , 38, 40

## 5. Ansprüche: Erfindung 21: Ansprüche 11-14, 17-19 (teilweise)

Genprodukt enthaltend eine Aminosäuresequenz für eine PYD-Domäne aus dem Pyrin-Protein der Maus (SEQ ID NO: 60, Pycard.mm), Antikörper, medizinische Verwendung des Genprodukts

## 6. Ansprüche: Erfindung 22: Ansprüche 11-14, 17-19 (teilweise)

Genprodukt enthaltend eine Aminosäuresequenz für eine PYD-Domäne aus dem Pyrin-Protein der Ratte (SEQ ID NO: 61, Pycard.mm), Antikörper, medizinische Verwendung des Genprodukts

## 7. Ansprüche: Erfindungen 23-26: Ansprüche 11-14, 17-19 (teilweise)

analog für Genprodukte mit SEQ ID NO: 63, 82, 83, 84

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/12545

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9947669 A	23-09-1999	DE 19813839 A	23-09-1999
		EP 1236799 A	04-09-2002
		EP 1064379 A	03-01-2001
		JP 2002506643 T	05-03-2002
WO 0070047 A	23-11-2000	AU 5134600 A	05-12-2000
		EP 1179065 A	13-02-2002
		US 2002076762 A	20-06-2002